



UNICAMP

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA

**ÀREA DE CONCENTRAÇÃO EM DESENVOLVIMENTO DE
PROCESSOS BIOTECNOLÓGICOS**

**SEPARAÇÃO DO RACEMATO N-Boc-ROLIPRAM PELO
PROCESSO CROMATOGRÁFICO DE LEITO MÓVEL
SIMULADO UTILIZANDO FASE ESTACIONÁRIA QUIRAL
TRIS-(3,5-DIMETILFENILCARBAMATO DE CELULOSE)
SUPPORTADA EM SÍLICA**

Autora: M. Sc. Caroline Vieira Gonçalves

Orientador: Prof. Dr. Cesar Costapinto Santana

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Engenharia Química, no dia 19 de Abril de 2005 como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título Doutor em Engenharia Química.

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

18/IV/2005

UNIDADE	AC
Nº CHAMADA	7/Unicamp
	G586s
V	EX
TOMBO BCI	64291
PROC.	46-P-00086-05
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	11,00
DATA	13/06/05
Nº CPD	

Bibid: 35 3169

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

G586s

Gonçalves, Caroline Vieira

Separação do racemato *N*-Boc-Rolipram pelo processo cromatográfico de leito móvel simulado utilizando fase estacionária quiral tris-(3,5 – dimetilfenilcarbamato de celulose) suportada em sílica / Caroline Vieira Gonçalves. - Campinas, SP: [s.n.], 2005.

Orientador: Cesar Costapinto Santana.

Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química.

1. Drogas quirais. 2. Antidepressivos. 3. Adsorção. 4. Separação (Tecnologia). I. Santana, Cesar Costapinto. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Química. III. Título.

RMS

Titulo em Inglês: Separation of the *N*-Boc-Rolipram racemate by the simulated moving bed chromatographic process using the chiral stationary phase tris-(3,5– dimethylphenylcarbamoil cellulose) supported on silica

Palavras-chave em Inglês: Chiral drugs, Antidepressants, Adsorptions e Separation technology

Área de concentração: Desenvolvimento de Processos Biotecnológicos

Titulação: Doutora em Engenharia Química

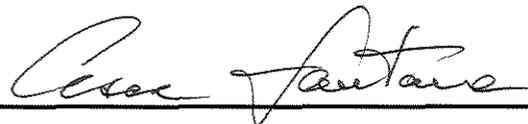
Banca examinadora: Célio Loureiro Cavalcante Junior, Carlos Roque

Duarte Correa, José Augusto Rosário Rodriguez e

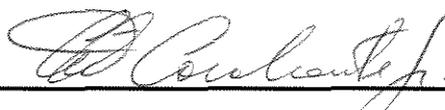
Marco Aurélio Cremasco

Data da defesa: 19/04/2005

Tese de Doutorado defendida por Caroline Vieira Gonçalves e aprovada em 19 de Abril de 2005 pela banca examinadora constituída pelos doutores:



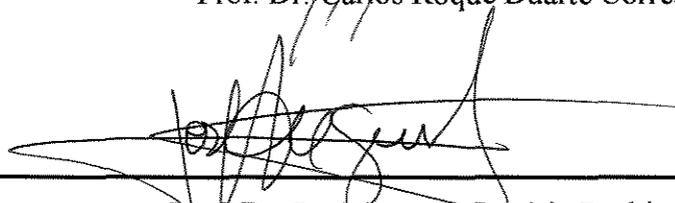
Prof. Dr. – Orientador César Costapinto Santana



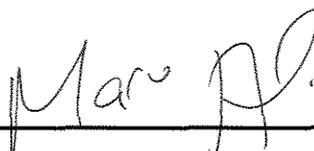
Prof. Dr. Célio Loureiro Cavalcante Jr



Prof. Dr. Carlos Roque Duarte Correa



Prof. Dr. José Augusto Rósario Rodriguez



Prof. Dr. Marco Aurélio Cremasco

Este exemplar corresponde à versão final da Tese de Doutorado em Engenharia
Química.

A handwritten signature in black ink, reading "Cesar Fontana". The signature is written in a cursive style with a large initial 'C' and 'F'. It is positioned above a horizontal line.

Orientador

A mainha, Jaquinha e Renata

“Caríssimos, amemo-nos uns aos outros, porque o amor vem de Deus, e todo o que ama é nascido de Deus e conhece a Deus. Aquele que não ama não conhece a Deus, porque Deus é amor”

(I Jo 4, 7-8)

AGRADECIMENTOS

Ao único Deus, “Porque o senhor dá a sabedoria; da sua boca procedem à ciência e a prudência. Ele reserva para os retos a salvação; e é um escudo para os que caminham com integridade” (Provérbios 2, 6-7)

Ao Professor César Costapinto Santana, pela orientação e amizade;

À minha família cearense, tão longe e ao mesmo tempo tão perto, por acreditar em mim durante todos esses anos;

À minha família “paulista”, Lurdes, Assis, Érica, Rodolfo, Fofa, Edna, Gabriela e Isabela, que construíram um pedacinho do Ceará no meio da hospitalidade campineira;

Aos colegas do Laboratório de Biosseparações, Mirela, Elcimar, Marco Garcia, Marco Torres, Paulo, Tatiana e João Paulo, pelo apoio e por toda amizade dedicada;

Aos amigos Isa, Mariana, Luciana, Betânia, Kiki, Rodrigo, Lívio, Sérgio, Helder, Paulo Zulu, Glauco, Moysés, Leonardo, Valéria, Goran, Erica, Geórgia e Fabiana pelo carinho e solidariedade;

Ao LIMBio (Laboratório de Interação Molecular e Bioengenharia), pela utilização do HPLC;

Ao DTF (Departamento de Termofluidodinâmica), pelas análises físicas realizadas;

A todos os funcionários da FEQ (Faculdade de Engenharia Química), especialmente a Rosa – secretária do DPB e ao Daniel – funcionário da oficina, pela paciência e disposição em me ajudar;

A todos os amigos do Instituto de Química da UNICAMP e da Química da UFSCAR, pela gentileza em nos ceder suas instalações para a síntese da fase estacionária quiral;

Ao Instituto de Química da UNICAMP, pela matéria-prima *N*-Boc-Rolipram;

A CAPES, FAPESP e CNPq, órgãos financiadores do projeto de pesquisa.

RESUMO

Fases Estacionárias Quirais (FEQs) têm-se mostrado eficientes na resolução de racematos. O Rolipram, (\pm)-4-(3-(ciclopentiloxi)-4-metoxifenil)-2-pirrolidinona, é um antidepressivo que tem apresentado importantes propriedades farmacológicas. A purificação do Rolipram na FEQ tris(3,5-dimetilfenilcarbamato) de celulose adsorvida em sílica através da cromatografia contínua de Leito Móvel Simulado (LMS) foi o objetivo principal deste trabalho. A FEQ foi sintetizada e suas propriedades foram determinadas por análises físicas e químicas. Através de experimentos de adsorção em coluna foram determinados a influência da temperatura sobre o fator de separação (α), as isotermas competitivas de adsorção da mistura racêmica e os parâmetros cinéticos e de equilíbrio da separação do *N*-Boc-Rolipram na FEQ sintetizada. Os experimentos realizados na unidade LMS foram feitos, sob condições diluídas, à temperatura ambiente. O *N*-Boc-Rolipram foi separado na FEQ sintetizada através do processo cromatográfico contínuo de LMS. As constantes de adsorção de Henry são discutidas e revelam um fator de separação da ordem de 1,20. As medidas de pureza e excesso enantiomérico das correntes de extrato e refinado foram determinadas. As análises físicas e químicas da FEQ sintetizada revelam boa concordância com os valores teóricos. Efeitos da temperatura sobre o fator de separação mostram que o processo de adsorção é entalpicamente controlado. Ambos os enantiômeros adsorvem de maneira semelhante na FEQ sintetizada, mas estudos detalhados precisam ser realizados para uma melhor compreensão do processo de adsorção. Os parâmetros de equilíbrio e cinética revelam o bom desempenho da FEQ sintetizada na separação dos enantiômeros principalmente o *R*-Boc-Rolipram.

Palavras-chaves: tris(3,5 – dimetilfenilcarbamato de celulose) suportada em sílica, LMS, *N*-Boc-Rolipram.

ABSTRACT

Chiral stationary phases (CSPs) have shown efficiency in racemate purification. Rolipram, (\pm)-4-(3-(cyclopentyloxy)-4-methoxyphenyl)-pyrrolidin-2-one, is an antidepressant with significant pharmacological properties. The main objective of this work was Rolipram purification in the Chiral Stationary Phase tris(3,5-dimethylphenylcarbamoyl) cellulose supported on silica by Simulated Moving Bed continuous chromatography. CSP was synthesized and its properties were determined by physical and chemical analysis. Kinetics and equilibrium parameters of the *N*-Boc-Rolipram, effect of the temperature on the separation factor (α) and competitive isotherms of the racemic mixture were evaluated by adsorption experiments with columns packed with the synthesized CSP. The experiments in the SMB unit were carried out under diluted conditions at room temperature. The *N*-Boc-Rolipram racemate was separated on the synthesized CSP by the SMB continuous chromatographic process. Henry constants are discussed and reveal Selectivity close to 1,20. Purity and enantiomeric excess of extract and raffinate streams were determined. Chemicals and physicals analyses of the CSP obtained find good agreement with theoretical results. The effects of the temperature on the separation factor show that adsorption process is controlled by the enthalpy. Both enantiomers adsorb similarly on the synthesized CSP, but detailed studies need to be making for a good understanding of the adsorption process. Kinetics and equilibrium parameters show good performance of the synthesized CSP to separate the enantiomers, mainly *R*-Boc-Rolipram racemate.

Keywords: tris(3,5-dimethylphenylcarbamoyl) cellulose supported on silica, SMB, *N*-Boc-Rolipram.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Escopo deste trabalho.....	2
1.2 Objetivo.....	2
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1 PRINCÍPIOS FUNDAMENTAIS DA ESTEREOQUÍMICA.....	5
2.1.1 Introdução.....	5
2.1.2 Estereoquímica e estereoisomerismo	5
2.1.3 Enantiômeros.....	7
2.1.4 Quiralidade.....	8
2.1.4.1 O centro quiral.....	9
2.1.5 Configuração.....	9
2.1.6 A modificação racêmica.....	10
2.1.7 Síntese de compostos quirais.....	10
2.2. NEUROTRANSMISSORES E DROGAS.....	12
2.2.1 Introdução.....	12
2.2.2 O neurônio.....	13
2.2.3 Rolipram.....	14
2.3 SÍNTESE DE FASES ESTACIONÁRIAS QUIRAIS (FEQs).....	18
2.3.1 Introdução.....	18
2.3.2 Fases Estacionárias Quirais.....	20
2.3.3 Características físicas e químicas das Fases Estacionárias Quirais.....	20
2.3.3.1 Propriedades físicas e químicas.....	21
2.3.3.2 Capacidade de adsorção.....	22

2.3.3.3 Produtividade.....	23
2.3.4 Fase móvel e retenção.....	24
2.3.5 Fase móvel e estereosseletividade.....	24
2.3.6 Solubilidade do soluto quiral.....	25
2.3.7 Seleção da FEQ.....	25
2.3.7.1 Fases quirais disponíveis.....	25
2.3.7.2 Fases estacionárias quirais baseadas em celulose.....	29
2.3.8 Mecanismo de reconhecimento quiral dos fenilcarbamatos de polissacarídeos.....	30
2.3.8.1 Fase móvel e a fase estacionária fenilcarbamato de celulose.....	32
2.4 O MÉTODO DA CROMATOGRAFIA EM PULSO.....	35
2.4.1 Introdução.....	35
2.4.2 O Método da cromatografia em pulso.....	35
2.4.2.1 Principais características de um pico cromatográfico.....	36
2.4.2.2 Altura Equivalente de Pratos Teóricos.....	37
2.4.2.3 O tempo de retenção.....	39
2.4.3 Parâmetros que afetam a eficiência da coluna cromatográfica.....	40
2.4.3.1 Efeitos de dispersão axial	40
2.4.3.2 Efeitos de resistência à transferência de massa.....	41
2.4.4 Modelagem matemática do leito fixo de adsorção.....	41
2.4.4.1 Desenvolvimento do modelo.....	42
2.4.4.2 Modelo matemático da adsorção em leito fixo.....	42
2.4.4.3 Soluções.....	44
2.5 A TECNOLOGIA DO LEITO MÓVEL SIMULADO (LMS)	46
2.5.1 Introdução.....	46
2.5.2 A tecnologia do Leito Móvel Simulado.....	47
2.5.2.1 Determinação das condições de operação do LMS.....	49

3 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	53
3.1 Síntese da Fase Estacionária Quiral.....	54
3.1.1 Síntese do tris (3,5-dimetilfenil carbamato) de celulose.....	54
3.1.2 Cobertura dos carbamatos ao suporte <i>APS-Nucleosil</i>	55
3.1.3 Empacotamento da coluna quiral.....	56
3.2 Caracterização da FEQ.....	56
3.2.1 Caracterização da sílica <i>APS-Nucleosil</i>	57
3.2.2 Caracterização do tris(3, 5 dimetilfenilcarbamato de celulose).....	57
3.2.3 Caracterização da FEQ.....	57
3.3 Corridas cromatográficas em fase líquida.....	58
3.3.1 Materiais e equipamentos.....	58
3.3.2 A cromatografia em pulso.....	59
3.3.2.1 Método de análise para uma resposta cromatográfica.....	60
3.3.2.2 Correções para o volume morto.....	61
3.3.3 Parâmetros determinados experimentalmente.....	62
3.3.3.1 Volume morto.....	62
3.3.3.2 Porosidades do leito, total e da partícula.....	62
3.3.3.3 Coeficiente de dispersão axial.....	63
3.3.3.4 Determinação dos parâmetros de Gibbs-Helmhotz.....	64
3.4 Determinação experimental da isoterma de adsorção competitiva.....	65
3.5 Corridas experimentais no sistema de Leito Móvel Simulado.....	66
3.5.1 Caracterização do leito de adsorção.....	69
3.5.2 Determinação das isotermas lineares.....	69
3.5.3 Procedimento para se projetar às condições operacionais da unidade LMS a partir das isotermas lineares.....	71
3.5.4 Análise das correntes de saída.....	72
3.5.5 Determinação de outros parâmetros de desempenho da unidade LMS.....	74

4 RESULTADOS PRELIMINARES E DISCUSSÃO.....	75
4.1 Síntese e caracterização da fase estacionária quiral tris(3,5 dimetilfenilcarbamato de celulose) suportada em sílica	76
4.2 Corridas cromatográficas em leito fixo.....	84
4.3 Corridas cromatográficas no sistema de Leito Móvel Simulado.....	97
5 CONCLUSÕES.....	112
6 SUGESTÕES PARA FUTUROS TRABALHOS.....	114
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	115

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1: Formas isoméricas do C ₄ H ₁₀	6
Figura 2.2: Formas isoméricas do 1,2 – Dicloroeteno.....	6
Figura 2.3: Formas isoméricas do 2, 3 –Dicloropentano.....	7
Figura 2.4: Formas enantioméricas do 2-Butanol.....	8
Figura 2.5: Sítios nos quais as drogas podem modificar a neurotransmissão.....	13
Figura 2.6: Estrutura do racemato Rolipram.....	15
Figura 2.7: Estrutura do racemato <i>N</i> -Boc-Rolipram.....	17
Figura 2.8: Exemplos de derivação aquiral para separações cromatográficas sobre triacetato de celulose (<i>CTA I</i>).....	19
Figura 2.9: Capacidade de saturação típica das FEQs disponíveis comercialmente.....	23
Figura 2.10: Estratégia geral para uma separação preparativa.....	26
Figura 2.11: Estrutura química das FEQs mais utilizadas em separações preparativas disponíveis comercialmente.....	28
Figura 2.12: Fases estacionárias quirais baseadas em celulose e amilose.....	29
Figura 2.13: Estrutura do trisfenilcarbamato de celulose.....	31
Figura 2.14: Interação esquemática dos racematos com o resíduo carbamato.....	32
Figura 2.15: Processo de imobilização das FEQs baseadas em polissacarídeos de acordo com Francotte e Zhang.....	33
Figura 2.16: Separação cromatográfica de enantiômeros na tris(3,5-dimetilfenilcarbamato) de celulose adsorvida em sílica gel (7µm, 4000 Å) antes (--) e depois() da imobilização (coluna, 4 X 250 mm).....	34
Figura 2.17: Representação de uma Curva Cromatográfica.....	37
Figura 2.18: Efeito do empacotamento da coluna sobre o <i>HETP</i>	39

Figura 2.19: Esquema do Leito Móvel Verdadeiro (LMV).....	48
Figura 2.20 Esquema do Leito Móvel Simulado (LMS).....	49
Figura 2.21: Diagrama geral de separação completa na unidade LMS para sistemas diluídos.....	51
Figura 2.22: Diagrama geral de separação completa na unidade LMS sob condições não-ideais.....	52
Figura 3.1: Balão de vidro ondulado especial para revestimento.....	55
Figura 3.2: Esquema da unidade LMS.....	67
Figura 3.3: Desenho detalhado da unidade de Leito Móvel Simulado.....	68
Figura 3.4: Região de separação completa do Rolipram em <i>MCTA</i> a 25°C.....	70
Figura 4.1: Distribuição do tamanho de partícula da sílica <i>APS</i> - Nucleosil.....	76
Figura 4.2: Distribuição do tamanho de poro da sílica <i>APS</i> -Nucleosil.....	77
Figura 4.3: Isoterma de adsorção da sílica <i>APS</i> - Nucleosil.....	77
Figura 4.4: Estrutura do derivado celulósico DMFCC.....	78
Figura 4.5: Infravermelho do DMFCC sintetizado.....	79
Figura 4.6: Micrografia da tris(3,5 dimetilfenilcarbamato) de celulose suportada em sílica Nucleosil.....	80
Figura 4.7: Distribuição do tamanho de partícula para a FEQ.....	81
Figura 4.8: Análise de EDX do DMFCC.....	82
Figura 4.9: Curva TGA para a FEQ.....	82
Figura 4.10: Curva DTGA para a FEQ.....	83
Figura 4.11: Curva DSC para a FEQ.....	83
Figura 4.12: Separação do racemato <i>N</i> - Boc-Rolipram . Coluna 1 (0,45 x 15 cm). Fase móvel: hexano/isopropanol 90:10. T - 25°C. Vazão: 0,7 mL/min. Faixa de medida: 270nm. Volume de injeção: 25 µL.....	84
Figura 4.13: Separação do racemato Rolipram em <i>MCTA</i> . Coluna 1 (0,45 x 15 cm). Fase móvel: Etanol 100% .T - 25°C. Vazão - 0.7 mL/min. Faixa de medida: 254 nm. Volume de injeção: 25 µL.....	85

Figura 4.14: Porosidade global da coluna quiral analítica 1 – Coluna 1 (0,45 x 15 cm). Fase móvel: hexano/isopropanol 90:10. T- 25°C.....	86
Figura 4.15: Porosidade global da coluna quiral analítica 2 – Coluna 2 (0,45 x 25 cm). Fase móvel: hexano/isopropanol 90:10. T- 25°C.	86
Figura 4.16: Valores de dispersão axial da coluna quiral analítica 1. Coluna 1 (0,45 x 15 cm). Fase móvel: hexano/isopropanol 90:10. T- 25°C.....	87
Figura 4.17: Valores de dispersão axial da coluna quiral analítica 2. Coluna 2 (0,45 x 25 cm). Fase móvel: hexano/isopropanol 90:10. T- 25°C.....	88
Figura 4.18: Influência da temperatura sobre as constantes de Henry do <i>N</i> -Boc-Rolipram. Coluna 1 : 0,45 cm x 15 cm. Fase móvel: hexano/isopropanol 90/10 v/v.....	89
Figura 4.19: Obtenção dos parâmetros de Gibbs-Helmholtz do <i>N</i> -Boc-Rolipram. Coluna 1: 0,45 cm x 15 cm. Fase móvel: hexano/isopropanol 90/10 v/v.....	90
Figura 4.20: Isoterma de adsorção competitiva do <i>N</i> -Boc-Rolipram. Coluna 1: 0,45 cm x 15 cm. Fase móvel: hexano/isopropanol 90/10 v/v. T - 25°C. $C_R = C_S$	91
Figura 4.21: Isoterma de dessorção competitiva do <i>N</i> -Boc-Rolipram. Coluna 1: 0,45 cm x 15 cm. Fase móvel: hexano/isopropanol 90/10 v/v. T 25°C. $C_R = C_S$	91
Figura 4.22: Curva de adsorção-dessorção competitiva do <i>N</i> -Boc-Rolipram. Coluna 1: 0,45 x 15 cm . Fase móvel: hexano/isopropanol 90/10 v/v. T - 25°C. Concentração: 1mg/mL.....	92
Figura 4.23: Curva de Adsorção-dessorção competitiva do <i>N</i> -Boc-Rolipram. Coluna 1: 0,45 x 15 cm. Fase móvel: hexano / Isopropanol 90/10 v/v. T - 25°C. Concentração: 10 mg/mL.....	92
Figura 4.24: Curva do 1ºmomento x L/u do <i>R</i> -Boc-Rolipram. Coluna 2: 0,45 x 25 cm. Fase móvel: hexano/isopropanol 90/10 v/v. T- 25°C. Concentração: 0,2 mg/mL	93
Figura 4.25: Curva do <i>HETP</i> x u do <i>R</i> -Boc-Rolipram. Coluna 2: 0,45 x 25 cm. Fase móvel: hexano/isopropanol 90/10 v/v. T- 25°C. Concentração: 0,2 mg/mL.....	94

Figura 4.26: Curva do 1º momento x L/u do <i>S</i> -Boc-Rolipram. Coluna 2: 0,45 x 25 cm. fase móvel: hexano/isopropanol 90/10 v/v. T- 25°C. Concentração: 0,2 mg/mL.....	94
Figura 4.27: Curva do <i>HETP</i> x u do <i>S</i> -Boc-Rolipram. Coluna 2: 0,45 x 25 cm. Fase móvel: hexano/isopropanol 90/10 v/v. T- 25°C. Concentração: 0,2 mg/mL.....	95
Figura 4.28: Perda de carga da oito colunas de adsorção. Colunas: 0,78 x 20 cm. Fase móvel: hexano/isopropanol 70/30 v/v. T- 25°C.....	98
Figura 4.29: Triângulos de separação para cada coluna da unidade LMS. Colunas: 0,78 x 20 cm. Fase móvel: hexano/isopropanol 70/30 v/v. Faixa de medida: 270 nm. T- 25°C.....	99
Figura 4.30: Triângulo de separação do <i>N</i> -Boc-Rolipram na tris(3,5 DMFCC) suportada em sílica a 25°C.....	100
Figura 4.31: Sinal do UV/Visível para o experimento na condição 1.....	101
Figura 4.32: Sinal do polarímetro para o experimento na condição 1.....	101
Figura 4.33: Cromatograma da corrente de dessorvente de saída na condição 1.....	102
Figura 4.34: Perfil interno a 25% do período.....	104
Figura 4.35: Perfil interno a 50% do período.....	104
Figura 4.36: Perfil interno a 75% do período.....	105
Figura 4.37: Sinal do UV/Visível para o experimento na condição 2.....	107
Figura 4.38: Sinal do polarímetro para o experimento na condição 2.....	108
Figura 4.39: Cromatograma da corrente de dessorvente de saída na condição 2.....	108
Figura 4.40: Perfil interno a 25% do período.....	109
Figura 4.41: Perfil interno a 50% do período.....	109
Figura 4.42: Perfil interno a 75% do período.....	110

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1: Estratégias de separação enantiosseletiva por cromatografia.....	18
Tabela 2.2: Fases estacionárias quirais mais comumente utilizadas em separações preparativas.....	27
Tabela 4.1: Valores calculados e experimentais do carbamato sintetizado obtido por CHN.....	78
Tabela 4.2: Parâmetros cinéticos e de equilíbrio dos enantiômeros do <i>N</i> -Boc-Rolipram.....	96
Tabela 4.3: Constantes de Henry, fator de separação e porosidades global e do leito para as colunas da unidade LMS.....	97
Tabela 4.4 – Condições de operação no LMS sob a condição 1 $t^* = 20$ min.....	100
Tabela 4.5: Análise da Pureza e do Excesso Enantiomérico das Correntes de Extrato e Refinado.....	103
Tabela 4.6 – Condições de Operação no LMS sob a Condição 2 $t^* = 20$ min.....	106
Tabela 4.7: Análise da pureza e do excesso enantiomérico das correntes de extrato e refinado.....	108

LISTA DE SÍMBOLOS E NOTAÇÕES

$(Bi)_m$	Número de Biot mássico (adimensional)
Boc	<i>N</i> -t-butoxicarbonila
c	Concentração de adsorbato na fase fluida (mol.L)
c_o	Concentração de adsorbato na fase fluida nas condições iniciais (mol.L)
c_e	Concentração de adsorbato na fase fluida externa à partícula (mol.L)
c_e^o	Concentração de adsorbato na fase fluida externa à partícula nas condições iniciais(mol.L)
c_e^F	Concentração de adsorbato na alimentação da coluna (mol.L)
c_i^o	Concentração de adsorbato na fase fluida no interior da partícula nas condições iniciais(mol.L)
c_i	Concentração de adsorbato na fase fluida no interior da partícula (mol.L)
c_i^d	Concentração, no equilíbrio, de cada componente no volume eluído na etapa de dessorção (mg/mL)
c_F	Concentração da alimentação (g/L)
c_i^F	Concentração de cada componente na alimentação (mg/mL)
d_p	Diâmetro da partícula
D_{ent}	Vazão da corrente de Dessorvente de Entrada (mL/min)
D_{saida}	Vazão da corrente de Dessorvente de Saída(mL/min)
D_m	Difusividade molecular ($m^2 s^{-1}$)
D_P	Difusividade no poro ($m^2 s^{-1}$)

$e.e$	Excesso enantiomérico (%)
Ext	Vazão da corrente de Extrato (mL/min)
F	Vazão da corrente de Alimentação (mL/min)
H	Constante de Henry adimensional
ΔH°	Calor padrão de formação (kJ mol ⁻¹)
ΔS°	Entropia absoluta padrão (J K ⁻¹ mol ⁻¹)
K_L	Coefficiente global de transferência de massa (m.s ⁻¹)
k_f	Coefficiente de transferência de massa no filme (m.s ⁻¹)
L	Comprimento do leito (cm)
N	Número de pratos teóricos
m_j	Razão entre volume de líquido e sólido (adimensional)
P	Pureza (%)
\bar{q}	Concentração média de adsorbato no interior do adsorvente (mol.L)
q_i^*	Concentração total, no equilíbrio, de cada componente retido no interior das partículas (mg/mL)
q_j	Concentração de adsorbato na fase sólida (mol.L)
q_j°	Concentração de adsorbato na fase sólida nas condições iniciais (mol.L)
Q	Vazão (mL.min ⁻¹)
Q_j^{LMS}	Vazão volumétrica de líquido na secção j da unidade LMS
R	Constante dos Gases (J K ⁻¹ .mol ⁻¹)
Re	Vazão da corrente de Refinado (mL/min)
R_p	Raio da partícula (μ)

Sh	Número de Sherwood (adimensional)
Sc	Número de Schimidt (adimensional)
t	Tempo (s)
t_{oR}	Tempo de retenção zero (s)
t_m	Tempo de residência médio (s)
t_r	Tempo de retenção (s)
t^*	Tempo de troca
u	Velocidade superficial ($m.s^{-1}$)
V	Volume da Coluna do LMS (mL)
V^c	Volume da Coluna (mL)
V^d	Volume eluído (mL)
V_m	Volume morto da unidade LMS (mL)
x, z	Coordenadas

LETRAS GREGAS

α	Coeficiente de Separação
$\delta(t)$	Função delta de Dirac
ε	Porosidade do leito
ε_p	Porosidade da partícula
$\varepsilon_T, \varepsilon^*$	Porosidade total

γ_i	Constantes geométricas
μ	Primeiro momento da resposta cromatográfica
v	Velocidade intersticial (cm.s^{-1})
σ^2	Segundo momento da resposta cromatográfica (s^2)

INTRODUÇÃO

Moléculas que se apresentam como uma imagem especular uma da outra e que não podem ser superpostas são denominadas quirais. As moléculas quirais são também denominadas enantiômeros e algumas vezes podem ocorrer em pares isoméricos (racemato).

Uma forma de se diferenciar um enantiômero do outro é através da sua interação com o plano da luz polarizada. Aquelas que apresentam rotação ótica positiva são denominadas destrógiras (ou destrorotatórias) e aquelas que apresentam rotação ótica negativa levógiras (ou levorotatórias).

As moléculas oticamente ativas atraem grande atração em virtude do fato de que sistemas vivos são quirais. Proteínas, ácidos nucleicos e polissacarídeos possuem estruturas quirais que estão relacionadas de maneira específica às funções desempenhadas por aquelas moléculas. Devido a quiralidade os organismos vivos respondem diferentemente do ponto de vista biológico aos pares de enantiômeros em fármacos, alimentos e pesticidas (ABOUL-ENEIN & ABOU-BASHA, 1997).

A obtenção de enantiômeros a partir dos racematos pode ser realizada através de duas formas: a abordagem racêmica e a abordagem quiral. A abordagem quiral consiste na elaboração de uma rota de síntese enantiosseletiva para o enantiômero desejado. Se ambos os enantiômeros são desejados, faz-se necessário o desenvolvimento de duas rotas de síntese independentes. Este método inclui a utilização de auxiliares quirais na rota sintética escolhida. Contrapondo-se a abordagem quiral a abordagem racêmica implica na preparação de misturas racêmicas a qual é subsequente resolvida nos seus enantiômeros correspondentes. Neste método os enantiômeros são obtidos através da separação dos seus diastereoisômeros por cromatografia ou cristalização salina; ou através da separação direta dos enantiômeros por cromatografia em fases estacionárias quirais (FEQs). O método cromatográfico normalmente fornece ambos os enantiômeros na sua forma oticamente ativa, principalmente pelo processo cromatográfico contínuo de Leito Móvel Simulado (LMS) (FRANCOTTE, 2001).

1.1 Escopo deste Trabalho

O (\pm) Rolipram[®] foi um fármaco desenvolvido pela Schering AG. Berlim (Alemanha) para atuar inicialmente como antidepressivo. Posteriormente, verificou-se que possuía outras atividades farmacológicas (antiinflamatório, antiparkinsoniano, imunossupressivo e neuroprotetivo) (DEMNITZ, J. *et al.* 1998), principalmente a sua forma enantiomérica (*R*). Atualmente, tem recebido atenção considerável da indústria farmacêutica em virtude do seu elevado valor econômico (10 mg do (*R*)-Rolipram custa aproximadamente U \$ 115,00) e da importância bioquímica do mesmo.

No entanto, o método empregado para a obtenção dos enantiômeros do Rolipram (abordagem quiral) constitui-se em uma tecnologia onerosa e de baixa produtividade. Baseado neste fato, atualmente, tem-se procurado novas tecnologias de obtenção do fármaco, notadamente a cromatografia quiral contínua de LMS.

1.2 Objetivo

Neste contexto, pretende-se empregar uma outra forma de resolução do racemato *N*-Boc-Rolipram utilizando-se a tecnologia do LMS na FEQ tris(3,5-dimetilfenilcarbamato) de celulose suportada em sílica.

Esta fase estacionária foi inicialmente desenvolvida pela DAICEL (companhia Japonesa) com o nome comercial de CHIRALCEL OD e revelou-se eficiente na separação de diversas misturas racêmicas, inclusive o precursor do Rolipram (*N*-Boc-Rolipram). Seu desempenho, quanto à produtividade dos compostos separados tem se mostrado superior a outras FEQs utilizadas, porém o fabricante comercial não fornece quantidades inferiores a 1 Kg e está destinada a vendas em grandes quantidades a indústrias.

Tendo em vista o objetivo acima citado, pretende-se atingir as seguintes etapas:

1. Síntese em escala de centenas de gramas (100 – 500g) da Fase Estacionária Quiral tris(3,5 - dimetilfenilcarbamato) de celulose empregando sílica como suporte. Essa escala de preparação da fase estacionária é apropriada para a utilização em um sistema cromatográfico de colunas múltiplas (Leito Móvel Simulado), existente no laboratório de bioseparação da Faculdade de Engenharia Química da UNICAMP.
2. Determinação das condições experimentais de separação das misturas racêmicas constituídas dos enantiômeros *R* e *S* do Rolipram em coluna única contendo as fases estacionárias preparadas no item anterior. Serão estudadas as seguintes variáveis: vazão da mistura, a concentração inicial da mistura, a temperatura e a concentração da fase móvel a fim de se obter parâmetros cinéticos e termodinâmicos.
3. Utilização do sistema de cromatografia contínua de LMS para a separação das misturas racêmicas constituídas dos enantiômeros *R* e *S* do Rolipram. Serão obtidos para diversas vazões de operação os perfis estacionários de concentrações dos compostos individuais (enantiômeros) ao longo das quatro seções do sistema. Esses perfis permitem avaliar a dinâmica de separação do sistema na obtenção dos enantiômeros.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Esta parte do trabalho divide-se em 5 sub-capítulos:

1. Fundamentos da Estereoquímica
2. Drogas Neurotransmissoras
3. Síntese de Fases Estacionárias Quirais (FEQ)
4. O Método da Cromatografia em Pulso
5. A Tecnologia de Leito Móvel Simulado

Na primeira parte será definido o que é uma substância quiral, suas características e propriedades.

Na segunda parte serão abordados o processo de transmissão da informação entre os neurônios e a atuação do Rolipram neste processo.

Na terceira parte serão apresentados os tipos de FEQs, algumas propriedades e suas características.

Na quarta parte serão mostrados os fundamentos da cromatografia em pulso, assim como alguns trabalhos realizados com o objetivo de se estudar a dinâmica de adsorção em FEQs utilizando-se este método de separação.

Na quinta parte será mostrada toda a fundamentação teórica em que se baseia o método de separação contínua em Leito Móvel Simulado assim como o seu uso na separação de misturas racêmicas.

2.1 PRINCÍPIOS FUNDAMENTAIS DA ESTEREOQUÍMICA

2.1.1 Introdução

A Quiralidade é um fenômeno que faz parte do mundo em que vivemos. O corpo humano é estruturalmente quiral com o coração situando-se no lado esquerdo a partir do centro, e o fígado no lado direito. Alguns tipos de conchas helicoidais são quirais, e espiralam como um parafuso girando no sentido horário. Muitas plantas mostram quiralidade na forma como se enroscam em estruturas suportes. Algumas serpenteiam no sentido horário, outras no sentido anti-horário (SOLOMONS, 1996).

A maioria das moléculas que constitui plantas e animais é quiral, e quase sempre apenas uma única forma ocorre naturalmente. Assim, comemos pães e carnes opticamente ativos e vivemos em casas, usamos roupas e lemos livros feitos de celulose opticamente ativa. As proteínas que compõem nossos músculos e outros tecidos e as enzimas e hormônios que tornam possível o nosso crescimento e regulam os processos corporais são todos opticamente ativos.

Portanto, convivemos com substâncias opticamente ativas em uma extensão inimaginável.

2.1.2 Estereoquímica e estereoisomerismo

A ciência da química orgânica que estuda a relação entre a estrutura molecular tridimensional e sua propriedade é denominada estereoquímica (do grego *stereos*. Sólido).

Um aspecto da estereoquímica é o estereoisomerismo. Isômeros são compostos diferentes que possuem a mesma fórmula molecular. Classifica-se em isômeros constitucionais e não constitucionais.

Os isômeros constitucionais diferem entre si pelo grau de conectividade que os seus átomos apresentam. Alguns exemplos de isômeros constitucionais são apresentados na Figura. 2.1:

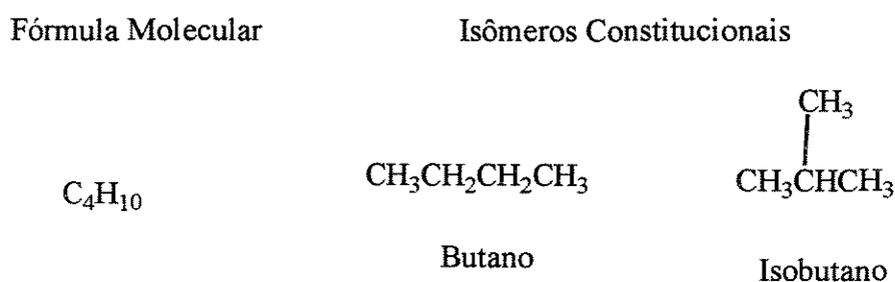


Figura 2.1: Formas isoméricas do C_4H_{10} (SOLOMONS, 1996)

Os isômeros não constitucionais, também conhecidos como estereoisômeros, possuem o mesmo grau de conectividade, diferenciando-se apenas pelo seu arranjo espacial. Um exemplo de estereoisomerismo é mostrado na Figura 2.2:

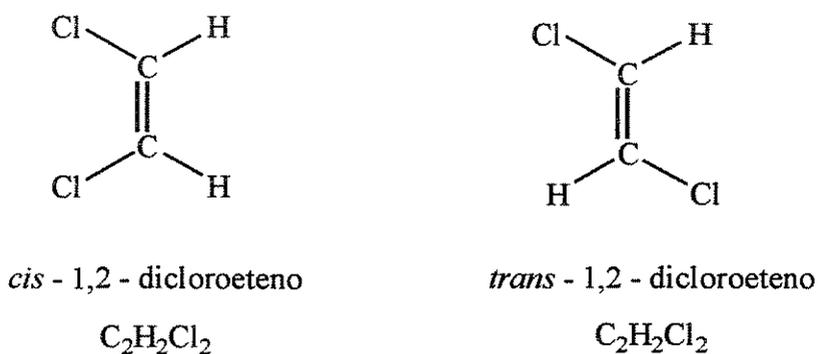


Figura 2.2: Formas isoméricas do 1,2 – dicloroeteno (SOLOMONS, 1996)

Os estereoisômeros podem ser subdivididos em duas categorias: enantiômeros e diastereoisômeros. Os enantiômeros são estereoisômeros cujas

moléculas são imagens especulares uma da outra. Os diastereoisômeros são estereoisômeros que não apresentam esta propriedade. As moléculas mostradas na Figura 2.3 são um exemplo de diastereoisômeros, uma vez que uma não é a imagem especular da outra.

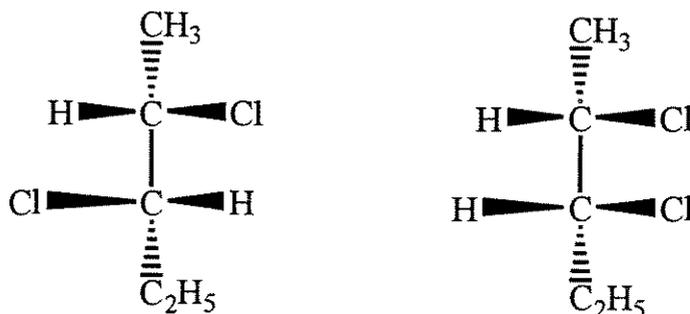


Figura 2.3: Formas isoméricas do 2, 3 –dicloropentano (MORRISON E BOYD, 1992).

2.1.3 Enantiômeros

Enantiômeros possuem propriedades físicas idênticas, exceto na direção da rotação do plano da luz polarizada. Conseqüentemente, para as substâncias enantioméricas, ponto de bolha, ponto de fusão, densidade, índice de refração ou qualquer outra propriedade física mensurável são iguais. No entanto, quando se considera a sua interação com a luz polarizada, um dos enantiômeros rotaciona o feixe de luz polarizado para a direita e o outro para a esquerda.

Também possuem propriedades químicas idênticas, exceto pela forma como interagem com reagentes opticamente ativos. Portanto, na ausência de reagentes ativos opticamente as substâncias enantioméricas comportam-se da mesma maneira (grau de dissociação, concentração, etc). Isto se deve ao fato de que os átomos que estão sob ataque tenham a sua reatividade influenciada pelos mesmos substituintes.

Nos casos em que o reagente é opticamente ativo (quiral) a influência exercida pelo reagente não é idêntica quanto ao ataque aos dois enantiômeros e as

taxas de reação são diferentes. Em alguns casos, apenas um dos isômeros interage com o reagente oticamente ativo. Em sistemas biológicos, por exemplo, tal especificidade estereoquímica é na maioria das vezes a regra, uma vez que todos os catalisadores, enzimas e compostos correlatos são ativos oticamente.

Portanto, enantiômeros possuem propriedades diferentes – físicas ou químicas – somente quando expostos a um meio quiral. Assim, para os enantiômeros apresentarem taxas reacionais diferenciadas, um meio quiral necessário à reação pode ser providenciado de diversas maneiras: por meio de um reagente oticamente ativo, por meio de um solvente quiral, pela superfície quiral de um adsorvente ou ainda, para algumas reações catalisadas pela luz, pela irradiação com a luz polarizada (ELIEL & WILEN, 1994).

2.1.4 Quiralidade

A quiralidade é condição necessária e suficiente para a existência de enantiômeros. Um composto cujas moléculas são quirais pode existir como enantiômero. Uma substância cujas moléculas não são quirais (sem quiralidade) não pode existir como enantiômero. A Figura 2.4 mostra um exemplo de compostos quirais:

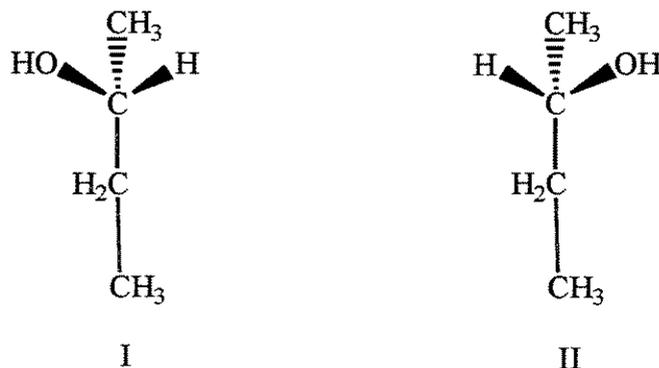


Figura 2.4: Formas enantioméricas do 2-butanol (MORRISON E BOYD, 1992)

2.1.4.1 O Centro Quiral

Um átomo de carbono que possua quatro ligantes diferentes é denominado centro quiral. (Às vezes, pode ser denominado carbono quiral quando é necessário distingui-lo do nitrogênio quiral, fósforo quiral, etc.).

Muitas, mas não todas, moléculas que contêm um centro quiral são quirais. Existem moléculas que contêm centros quirais, mas são aquirais. Estas moléculas aquirais (mesocompostos) sempre contêm mais de um centro quiral. No entanto, se existir apenas um único centro quiral na molécula, certamente, ela será quiral. Portanto, a presença ou ausência do centro quiral não é critério de quiralidade.

O reconhecimento da quiralidade de uma molécula se dá pela ausência de planos de simetria. Um plano de simetria é definido como um plano imaginário, que bisecciona uma molécula de tal forma, que a metade de uma molécula é a imagem especular da outra. O plano pode passar através dos átomos, entre os átomos ou ambos. Moléculas que possuem planos de simetria são aquirais (ELIEL & WILEN, 1994).

2.1.5 Configuração

O arranjo espacial de um estereoisômero particular é denominado de seu arranjo configuracional. A maneira mais prática de se definir a configuração de um enantiômero é pelo uso de prefixos. De acordo com as regras da IUPAC ao nome das substâncias enantioméricas deve-se acrescentar as designações *R* ou *S* (palavras originárias do latim *rectus* e *sinister*, significando direita e esquerda, respectivamente), baseado no procedimento citado por CAHN (1964) e PRELOG & INGOLD (1976).

A direção da rotação do plano da luz polarizada é normalmente incorporada aos nomes dos compostos opticamente ativos. A molécula que desvia o plano da luz polarizada para direita é designada como destrorotatória (+) e para a esquerda levorotatória (-).

2.1.6 A modificação racêmica

Uma mistura em partes iguais de substâncias enantioméricas é denominada modificação ou mistura racêmica. Uma modificação racêmica é opticamente inativa. Na modificação racêmica a rotação causada por uma molécula de um dos isômeros é cancelada por uma rotação igual e oposta provocada pelo seu enantiômero.

O prefixo \pm é utilizado para especificar a natureza racêmica de uma amostra particular, por exemplo, (\pm) ácido láctico ou (\pm) 2-metil-1-butanol.

A identidade da maioria das propriedades físicas dos enantiômeros tem uma consequência de enorme importância prática. Eles não podem ser separados por métodos comuns, tais como: destilação fracionada (em virtude dos seus pontos de bolha serem idênticos), cristalização fracionada (a não ser em um solvente ativo opticamente) e cromatografia (em virtude de possuírem as mesmas constantes de equilíbrio de adsorção, exceto quando o adsorvente é quiral). Portanto, a separação de um racemato em enantiômeros – a resolução de uma modificação racêmica – requer um modo especial de procedimento (ELIEL & WILEN, 1994).

2.1.7 Síntese de compostos quirais

A síntese de um composto quiral a partir de reagentes aquirais sempre produzirá a modificação racêmica, ou seja, reagentes opticamente inativos resultarão em produtos opticamente inativos.

Um outro aspecto relevante na obtenção de compostos quirais são as reações de retenção de configuração. Reações que se desenvolvam sem a quebra de ligações no centro quiral são processos que se realizam com retenção de configuração do mesmo. Caso uma ligação no centro quiral seja quebrada, a configuração mudará. Este tipo de reação permite obter uma importante informação a respeito de compostos puros opticamente: sua rotação específica. Desta forma é possível conhecer o grau de pureza do mesmo. Por exemplo, caso

uma amostra de um composto, cuja rotação máxima é de $+1.67^\circ$ (100 % puro), possui uma rotação de $+0.835^\circ$, nós dizemos que ele é 50% opticamente puro (ELIEL & WILEN, 1994).

A reação de moléculas quirais com reagentes ativos opticamente permite a resolução da modificação racêmica, ou seja, a separação da modificação racêmica nos seus enantiômeros.

Alguns compostos ativos opticamente são obtidos de fontes naturais, uma vez que organismos vivos normalmente produzem apenas um enantiômero de um par enantiomérico. Desta forma, apenas (-)-2-metil-1-butanol é formado na fermentação de gomas e somente (+)-ácido láctico é formado na contração muscular. A partir destes compostos que ocorrem naturalmente é possível obter outros compostos opticamente ativos. O (-)-2-metil-1-butanol pode ser convertido, sem perda de configuração, no seu ácido ou sal correspondente.

A maioria dos compostos opticamente ativos é obtida pela resolução de uma modificação racêmica em seus enantiômeros. Uma boa parte destas resoluções é realizada por meio do uso de reagentes que são eles mesmos ativos opticamente, os quais são obtidos através de fontes naturais.

Uma boa parte destas resoluções depende da reação entre uma base orgânica e um ácido orgânico para produzir sais. Estes sais diastereoisoméricos possuem, naturalmente, propriedades físicas diferentes, incluindo a solubilidade em um determinado solvente. Eles podem, portanto, serem separados por cristalização fracionada. Uma vez que os dois sais estejam separados, os ácidos ativos opticamente podem ser recuperados a partir de cada sal através da adição de um ácido mineral forte aos mesmos (ELIEL & WILEN, 1994).

Portanto, independente do tipo de composto, a modificação racêmica pode ser convertida em uma mistura de diastereoisômeros, por meio de uma reação com um reagente opticamente ativo e, então, separada.

2.2 DROGAS NEUROTRANSMISSORAS

2.2.1 Introdução

A idéia de que terminações nervosas podem se comunicar com outras células através da liberação de pequenas quantidades de substâncias químicas nas suas junções tem crescido em importância através da observação dos efeitos de substâncias venenosas sobre animais. Este processo tem sido denominado transmissão neuroquímica, e as substâncias químicas liberadas de neurotransmissores.

Muitas substâncias químicas que agem como neurotransmissores têm sido identificadas, mas nem todas as substâncias associadas às terminações nervosas e capazes de alterar a atividade do sistema nervoso são neurotransmissoras.

Os critérios pelos quais uma substância química possa ser considerada neurotransmissora são as seguintes:

1. A substância deve ser sintetizada no interior do neurônio do qual está sendo liberado. As enzimas e substratos necessários à síntese devem estar presentes no neurônio.
2. Deve haver um mecanismo de estocagem dos neurotransmissores no interior do neurônio no qual foi produzido e será liberado.
3. Mecanismos de liberação dependentes de cálcio aparentemente ocorrem com todos os neurotransmissores. Tal liberação foi demonstrada como uma ocorrência de uma estimulação fisiológica de um caminho neuronal apropriado.
4. A aplicação exógena de um neurotransmissor sintético deve imitar as ações do transmissor verdadeiro quando este último é liberado em resposta a um estímulo elétrico ou fisiológico.

5. Deve haver um mecanismo para a interrupção rápida da ação de um neurotransmissor liberado. A substância aplicada exogeneamente deve ser inativada pelo mecanismo que age no verdadeiro neurotransmissor (KRUK & PYCOCK, 1991).

2.2.2 O Neurônio

O neurônio ou célula nervosa é a unidade de comunicação celular fundamental do sistema nervoso. É constituído pelo corpo celular nervoso ou pericarion, o qual contém o núcleo, retículo endoplasmático, aparato de Golgi e outros componentes necessários à síntese de proteínas e manutenção do metabolismo intermediário. A partir do pericarion há um ou mais filamentos longos chamados axônios, e numerosos filamentos curtos conhecidos como dendritos. Os dendritos são considerados os responsáveis pela recepção dos impulsos nervosos através de receptores especializados, enquanto os axônios são considerados como os responsáveis pelo envio de mensagens do neurônio as estruturas distantes localizadas nos terminais dos axônios. A Figura 2.5 mostra a estrutura simplificada e generalizada do neurônio.

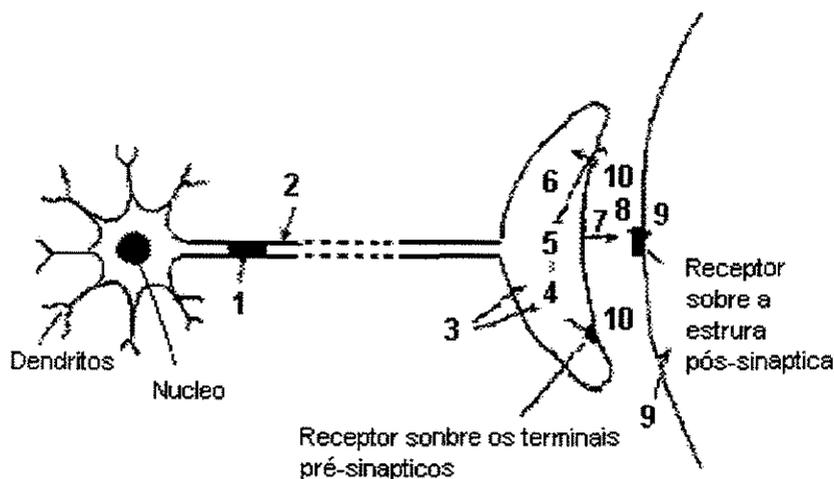


Figura 2.5: Sítios nos quais as drogas podem modificar a Neurotransmissão. 1- transporte axonal; 2-membrana axonal; 3-precursosores disponíveis; 4-síntese, 5-estocagem; 6-organelas intracelulares; 7-liberação; 8-receptores (pré- ou pós-sinápticos); 9- mecanismos pós-receptor; 10-inativação: enzimática ou *uptake*. (KRUK & PYCOCK, 1991).

A transferência de informação do neurônio a um tecido neuro efetivo é obtida através da liberação de substâncias químicas do nervo terminal. A substância química se difunde através da lacuna sináptica existente entre o nervo terminal e o tecido neuro efetivo e se combina através do sítio de reconhecimento (o receptor). Este processo de neurotransmissão química é suscetível à ação de drogas em diversos estágios da seqüência (KRUK & PYCOCK, 1991).

As células enviam mensagens umas às outras através da liberação de mensageiros ou moléculas de informação. Os neurotransmissores agem em receptores presentes na membrana neuronal de outro neurônio próximo daquele do qual o neurotransmissor foi liberado.

Os neurotransmissores fazem parte de um conjunto de moléculas de informação conhecidas como mensageiros primários. As células alvo dos mensageiros primários possuem mecanismos especializados de reconhecimento do mensageiro e de transferência da mensagem do exterior da célula ao seu interior. O sítio de reconhecimento é denominado receptor e este é conectado a um mecanismo de transdução que pode amplificar e distribuir a mensagem no interior da célula alvo. As moléculas geradas pelos mecanismos de transdução são denominadas mensageiras secundárias (KRUK & PYCOCK, 1991).

2.2.3 Rolipram

O Rolipram, (\pm) -4-(3-(ciclopentiloxi)-4(metoxifenil)-2-pirrolidinona, é um inibidor seletivo da fosfodiesterase conhecida como fosfodiesterase IV (PDEIV). Ela interage de maneira estereoseletiva e com elevada afinidade em sítios receptores do tecido cerebral e com a PDEIV humana recombinante. A Figura 2.6 mostra a estrutura do Rolipram.

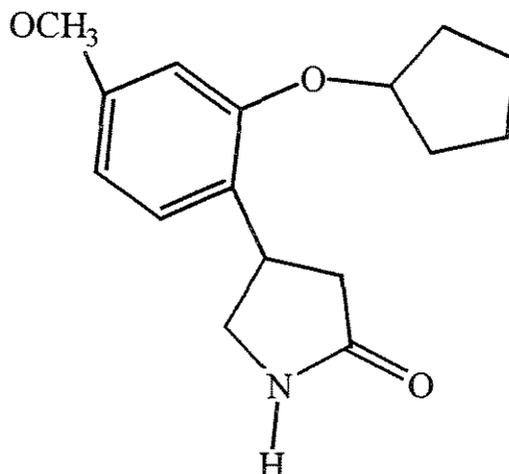


Figura 2.6: Estrutura do racemato Rolipram (CORREIA E GARCIA, 2001).

A PDEIV é responsável pela clivagem da ligação fosfodiéster presente no mensageiro secundário Adenosina-3', 5'-monofosfato cíclico (*cAMP*) desativando-o. A ação da PDEIV está relacionada a uma variedade de distúrbios fisiológicos tais como esclerose múltipla, falha coronariana, asma bronquial, enfermidades pulmonares crônicas, diabetes, etc (DEMnitz *et al.*, 1998).

Verificou-se também, através de experimentos em animais, que o enantiômero (-) apresenta um elevado potencial de inibição da atividade depressiva (BAURES *et al.*, 1993). Sabe-se que a depressão endógena aumenta a partir da redução da atividade neurotransmissora. Isto leva a uma diminuição da concentração de noradrenalina na região pós-sináptica, e, conseqüentemente, quantidades insuficientes do chamado segundo mensageiro, *cAMP*, são produzidos. A fim de contrabalançar esta escassez, antidepressivos convencionais melhoram a concentração de noradrenalina no espaço sináptico. Rolipram[®], em contraste, age pós sinápticamente pela inibição da enzima que desativa o *cAMP*, a fosfodiesterase, mantendo pois uma concentração elevada e constante do *cAMP*. Além disso, Rolipram[®] possui vantagens significativas quando comparado a outros antidepressivos. Sua dosagem de aplicação é consideravelmente menor e efeitos colaterais desagradáveis e perigosos, tais como secura da boca, problemas de visão e cardiotoxicidade não estão presentes (MULZER, 1994).

Há, ainda, estudos que mostram a eficácia do rolipram como um potente inibidor do fator de necrose tumoral, responsável pelo aparecimento de diversas doenças notadamente nos portadores de HIV e câncer (ANGEL *et al.*, 1995).

O perfil farmacocinético do rolipram já foi amplamente documentado por KRAUSE *et al.* (1990) e PFEFFER *et al.* (1990) e os dois enantiômeros têm sido descritos como “(R)-(-)-Rolipram” e “(S)-(+)-Rolipram”.

O (+)- Rolipram® foi desenvolvido inicialmente na Europa pela Schering AG., Berlim (SCHIMIECHEN *et al.* PAT. U.S. 4193926, 1980). Desde então, variadas rotas químicas sintéticas têm sido realizadas para a obtenção do Rolipram.

Na resolução da modificação racêmica alguns métodos têm sido utilizados. Entre eles, está o uso de um reagente opticamente ativo como a enzima lipase na rota sintética utilizada pela Schering Ag., Berlim.

No entanto, em virtude da elevada produtividade e pureza das substâncias enantioméricas obtidas, a forma mais promissora de obtenção dos enantiômeros a partir da mistura racêmica é através do uso de cromatografia quiral, notadamente através do sistema de LMS.

O racemato Rolipram na forma Boc (Figura 2.7) utilizado neste trabalho foi fornecido pelo Instituto de Química da UNICAMP cuja síntese foi realizada segundo metodologia de CORREIA & GARCÍA (2001).

Por meio do uso da fase estacionária quiral MCTA (triacetato de metil celulose) é possível a separação dos enantiômeros da mistura racêmica do Rolipram. Com dados obtidos no laboratório de Biosseparações da UNICAMP, a resolução apresentada por estes enantiômeros através do uso desta fase estacionária (MCTA) revelou-se inferior àquela apresentada pela tris(3,5- dimetilfenilcarbamato de celulose) suportada em sílica (DMFCC).

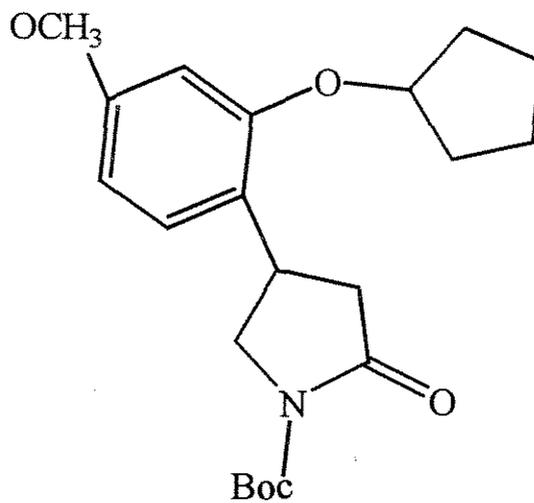


Figura 2.7: Estrutura do Racemato *N*-Boc-Rolipram (CORREIA E GARCIA, 2001).

2.3 SÍNTESE DE FASES ESTACIONÁRIA QUIRAIS (FEQs)

2.3.1 Introdução

A cromatografia sobre fases estacionárias quirais (FEQs) é um método bem estabelecido e aplicado com sucesso na determinação da composição enantiomérica de uma extensa variedade de compostos quirais (NAGAMATSU *et al.*, 1999; FRANCOFFE & RICHERT, 1997; WAINER, 1993; KRISTULOVIC, 1989; ZIEF & CRANE, 1988; OKAMOTO *et al.*, 1988). Com este objetivo duas estratégias podem ser empregadas (Tabela 2.1).

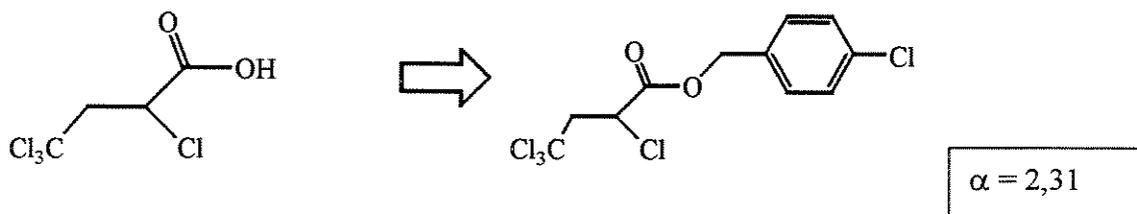
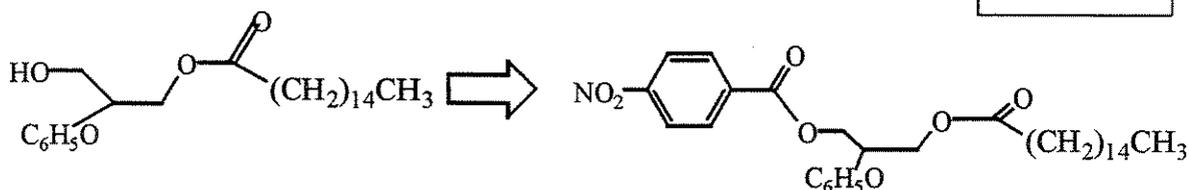
Cromatografia Enantiosseletiva sobre Fases Estacionárias Quirais

Estratégia 1	Estratégia 2
<p>Seleção ou Adaptação da Fase Estacionária ao Racemato</p>	<p>Adaptação do Solutu a Fase Estacionária</p>
<ul style="list-style-type: none"> • Avaliação randômica da FEQ • Escolha baseada na experiência pessoal ou no banco de dados • Abordagem Combinatória • Síntese de uma FEQ específica (utilizando correlações estruturais ou modelagem molecular) 	<ul style="list-style-type: none"> • Derivação do Racemato • Mudança a um precursor do composto desejado • Abordagem combinatória

Tabela 2.1: Estratégias de separação enantiosseletiva por cromatografia (FRANCOFFE, 2001).

A primeira estratégia consiste em selecionar a melhor FEQ para o composto racêmico de interesse. Na segunda estratégia, a abordagem consiste em selecionar uma FEQ apropriada e adaptar o soluto por meio da alteração da sua estrutura (Ex: derivação). A Figura 2.8 mostra um exemplo de uma derivação para separação cromatográfica.

Racematos não resolvidos no MCTA



Racematos resolvidos no MCTA

Figura 2.8: Exemplos de derivação aquiral para separações cromatográficas sobre triacetato de celulose (CTA I). Coluna, 1,25x30 cm. Fase Móvel, etanol/água 95/5 (FRANCOTTE, 1996).

Para compostos quirais de interesse biológico e especialmente nos estágios iniciais de desenvolvimento, geralmente é preferível separar o composto ativo, embora um intermediário particular tenha melhor resolução. Em separações em larga escala, a situação pode se inverter em virtude dos custos, e pode ser mais apropriado separar o intermediário sintético (FRANCOTTE, 2001).

2.3.2 Fases estacionárias quirais

Algumas características devem ser consideradas no desenvolvimento de uma fase estacionária em geral, tais como: disponibilidade, facilidade de preparação, custos de preparação relativamente baixos, durabilidade (estabilidade química e mecânica) e elevada capacidade e aplicabilidade.

Infelizmente, no desenvolvimento de uma FEQ a observância a todos estes fatores não é possível. No entanto, outros aspectos, tais como: resolução, produtividade, propriedades físico-químicas, escolha da fase móvel e capacidade de adsorção da FEQ tem importância fundamental.

Os fatores que afetam o poder de resolução de uma coluna cromatográfica quiral são os mesmos que afetam as colunas cromatográficas convencionais: tamanho de partícula, porosidade, área superficial, vazão de eluição, dimensões da coluna (SNYDER E KIRKLAND, 1979). Um fator de separação de no mínimo 1,2 – 1,3 é pré-requisito para separações preparativas.

2.3.3 Características físicas e químicas das fases estacionárias quirais

Algumas propriedades devem ser observadas quando da utilização de uma determinada FEQ. Um elevado número de fases quirais é baseada em material polimérico orgânico o qual exibe algumas restrições quanto às suas propriedades químicas, físicas e mecânicas. Por outro lado, um considerável número de FEQs tem sido desenvolvido através da fixação ou adsorção de compostos quirais de baixa massa molecular ou macromoléculas sobre sílica gel usada como suporte. Nestas circunstâncias apenas uma parte do material cromatográfico é capaz de realizar alguma discriminação quiral. Este fato pode reduzir apreciavelmente a capacidade de adsorção da fase estacionária (FRANCOTTE & JUNKER-BUCHHEIT, 1992).

2.3.3.1 Propriedades físicas e químicas

Fundamentalmente, há duas grandes classes de fases estacionárias quirais:

- 1- Materiais poliméricos na sua forma pura ou adsorvida sobre suportes macroporosos mecanicamente estáveis.
- 2- Materiais obtidos através de modificações químicas quirais sobre a superfície de um suporte estável (notadamente sílica gel).

Se não há ligações cruzadas, a maioria dos materiais poliméricos apresenta algum grau de solubilidade em um extenso conjunto de solventes. A maioria dos derivados de celulose apresenta esta limitação quanto à fase móvel empregada. Além disso, este efeito depende sobretudo da massa molecular ou da cristalinidade do polímero utilizado. Estas informações raramente são especificadas pelo fabricante (FRANCOTTE & JUNKER-BUCHHEIT, 1992).

Apesar das limitações citadas, os derivados de celulose são, provavelmente, as FEQs mais freqüentemente utilizadas em separações preparativas, em virtude da sua extensa faixa de aplicações e/ou sua elevada capacidade de adsorção. Algumas tentativas têm sido realizadas a fim de aumentar a estabilidade mecânica dos derivados celulósicos por meio de ligações cruzadas (*cross-linking*) (KLEMISCH & HODENBERG, 1985), mas sem muito sucesso. Uma possível explicação seria a alteração da estrutura cristalina pela introdução de ligações covalentes entre as cadeias poliméricas. A importância da estrutura (organização) dos cristais no poder de resolução destes tipos de adsorventes quirais tem sido investigada por FRANCOTTE *et al.* (1985).

Além disso, algumas fases estacionárias que possuem funções químicas de elevada reatividade podem ser alteradas pela injeção de determinados solutos.

2.3.3.2 Capacidade de adsorção

A capacidade de adsorção de uma fase estacionária é um parâmetro importante quando se deseja realizar separações em larga escala. Por essa mesma razão, apenas um número limitado de materiais tem sido aplicado normalmente entre o extenso conjunto de fases estacionárias quirais disponíveis. Entretanto, é importante ressaltar que a fase ótima, quando se considera sua capacidade de adsorção, pode variar de um racemato a outro dependendo da estrutura dos compostos racêmicos a serem resolvidos. Isto se deve ao número de sítios acessíveis de interação por unidade de massa da fase estacionária quiral (FRANCOTTE, 2001).

Geralmente, os adsorventes quirais são adsorvidos ou fixados covalentemente sobre superfícies modificadas de sílica gel macroporosa (SHIBATA *et al.*, 1986). Embora as propriedades mecânicas destes materiais sejam satisfatórias, eles possuem uma desvantagem: apenas uma parte do adsorvente contém a função quiral capaz de realizar a diferenciação entre os enantiômeros. Obviamente, este fator determinará a capacidade de adsorção deste material. Uma fase estacionária composta em sua grande maioria de sílica gel e poucos elementos quirais será rapidamente saturada.

Além disso, não apenas o número, mas também a disponibilidade de sítios adsorptivos de interação potencial é importante para a obtenção de adsorventes preparativos. De fato, este último fator está relacionado às propriedades físicas do material, tais como área superficial ou porosidade, aspectos estes importantes a serem considerados na síntese de adsorventes para cromatografia (FRANCOTTE, 2001). A capacidade de adsorção das fases estacionária mais utilizada é mostrada na Figura 2.9.

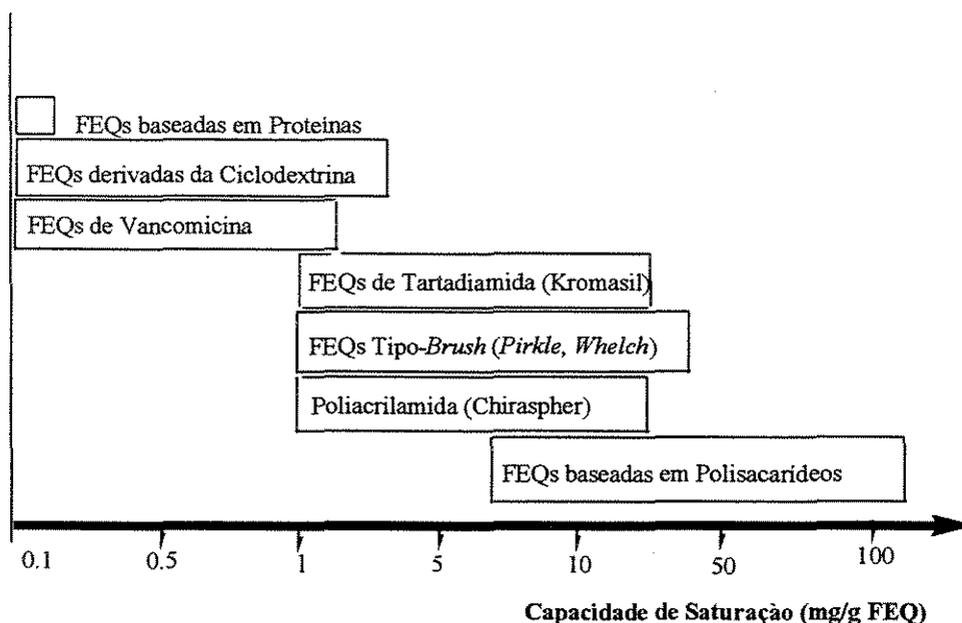


Figura 2.9: Capacidade de saturação típica das FEQs disponíveis comercialmente (FRANCOTTE, 2001)

2.3.3.3 Produtividade

Na cromatografia preparativa, a produtividade pode ser afetada por diferentes fatores tais como, capacidade de adsorção, eficiência da coluna, seletividade, temperatura, tamanho da coluna, vazão, tempo de ciclo e concentração na alimentação, a qual depende da solubilidade do soluto na fase móvel empregada (GOLSHAN-SHIRAZI & GUIOCHON, 1991). Alguns fatores estão relacionados às propriedades da fase estacionária quiral, outros às dos racematos, ou a operacionalidade do sistema.

Na cromatografia preparativa enantioseletiva, atenção especial deve ser dada à capacidade de adsorção da fase estacionária, à vazão, a qual é limitada pela resistência mecânica do material a pressão e sua granulometria, e à concentração na alimentação, a qual é normalmente relacionada à solubilidade do soluto na fase móvel empregada (FRANCOTTE, 2001).

2.3.4 Fase móvel e retenção

Extensivamente documentado na literatura, a fase móvel afeta consideravelmente o tempo de retenção na cromatografia.

Sob condições cromatográficas em fase normal, a redução no tempo de retenção é normalmente obtida através do aumento do teor do modificador polar. Álcoois como metanol, etanol e isopropanol são os modificadores polares mais comumente utilizados, especialmente com as fases baseadas em polissacarídeos. Entretanto, não é possível prever como estas mudanças podem afetar a resolução e a seletividade.

A possibilidade de gerenciar o tempo de retenção tem se tornado especialmente importante em conexão com a introdução da tecnologia do Leito Móvel simulado, a qual é mais efetiva em termos de produtividade quando pequenos tempos de ciclos são aplicados (FRANCOTTE, 2001).

2.3.5 Fase móvel e estereosseletividade

A fase móvel, que normalmente é considerada como um componente inerte, tem uma atuação importante no processo de interação. Ela não apenas influencia o tempo de retenção, mas pode afetar consideravelmente a seletividade.

Nas fases estacionárias baseadas em polissacarídeos a fase móvel possui importância significativa. Há exemplos de enantiômeros que não são separados pela mistura hexano/etanol 9/1 e são bem separadas na mesma fase estacionária com a mistura de hexano/2-propanol 9/1 (YASHIMA, 2001). Em alguns casos, o impacto da fase móvel é tão forte que mudar sua composição causa uma inversão da ordem de eluição.

2.3.6 Solubilidade do soluto quiral

Outro aspecto crítico relacionado à fase móvel é a solubilidade do soluto quiral (racemato) a ser separado na fase móvel utilizada. De fato, a solubilidade do soluto é, normalmente, o fator limitante em termos de produtividade.

Nas FEQs constituídas de seletores quirais quimicamente ligados a um suporte inerte (comumente sílica gel), não há limitações quanto à escolha da fase móvel e a seletividade é que governará a escolha. Na prática, um balanço entre a seletividade e a solubilidade deve ser encontrado (FRANCOTTE, 2001).

2.3.7 Seleção da FEQ

A seleção de uma FEQ adequada à separação de um determinado racemato divide-se em duas etapas. A primeira etapa consiste em uma série de experimentos em coluna analítica para avaliar o desempenho da FEQ selecionada quanto à separação do racemato. A segunda etapa consiste em um aumento de escala do processo de separação através do uso de colunas preparativas ou semi-preparativas e posterior utilização destas colunas no LMS. A Figura 2.10 mostra uma estratégia geral para a seleção de uma FEQ adequada.

2.3.7.1 Fases quirais disponíveis

A Tabela 2.2 sumariza as fases estacionárias quirais mais comumente usadas em separações preparativas e a Figura 2.11 mostra a estrutura química destas FEQs. Embora, a maioria destas fases esteja disponível em elevadas quantidades e possuam uma boa capacidade de adsorção, noventa por cento dos compostos racêmicos podem ser resolvidos utilizando-se não mais que quatro tipos de fases baseadas em polissacarídeos.

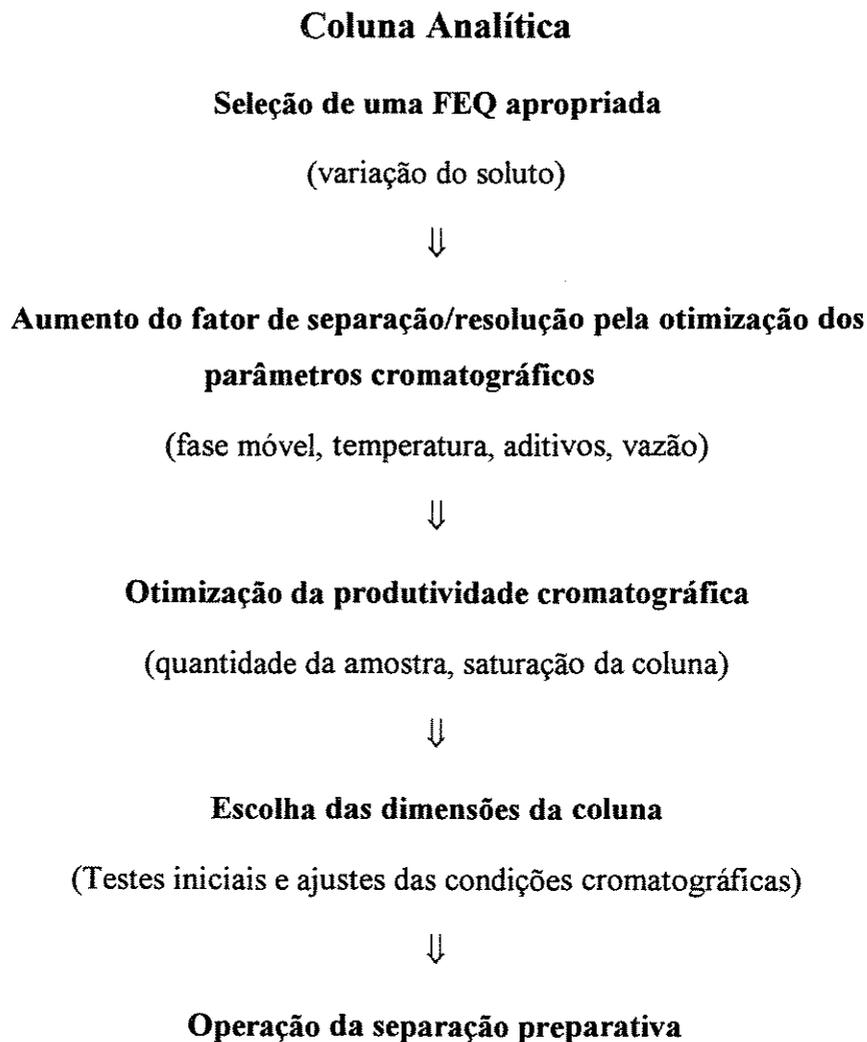


Figura 2.10: Estratégia geral para uma separação preparativa (FRANCOTTE & JUNKER-BUCHHEIT, 1992).

Tabela 2.2: Fases estacionárias quirais mais comumente utilizadas em separações preparativas (FRANCOTTE, 2001).

Nome Científico	Nome Comercial
Triacetato de Celulose	CTA I
Tris(3,5-dimetilfenilcarbamato) de Celulose	Chiralcel OD
Tris(4-metilbenzoato) de Celulose	Chiralcel OJ
Tribenzoato de Celulose	Chiralcel OB
Tris(3,5-dimetilfenilcarbamato) de Amilose	Chiralpack AD
Tris[(S)-(feniletilcarbamato) de Amilose	Chiralpack AS
Poly[(S)-N-acriloilfenilalanina etil éster]	Chiraspher
3,5-Dinitrobenzoilfenilglicina	DNBPG
Dialiltartramida di-(3,5-dimetilbenzoil)-L cruzada	Kromasil CHI-DMB
Dialiltartramida di-(4- <i>tert.</i> -butilbenzoil)-L cruzada	Kromasil CHI-TTB
3,5-dinitrobenzamida de tetrahydro-aminofenantreno	WHELK -O 1

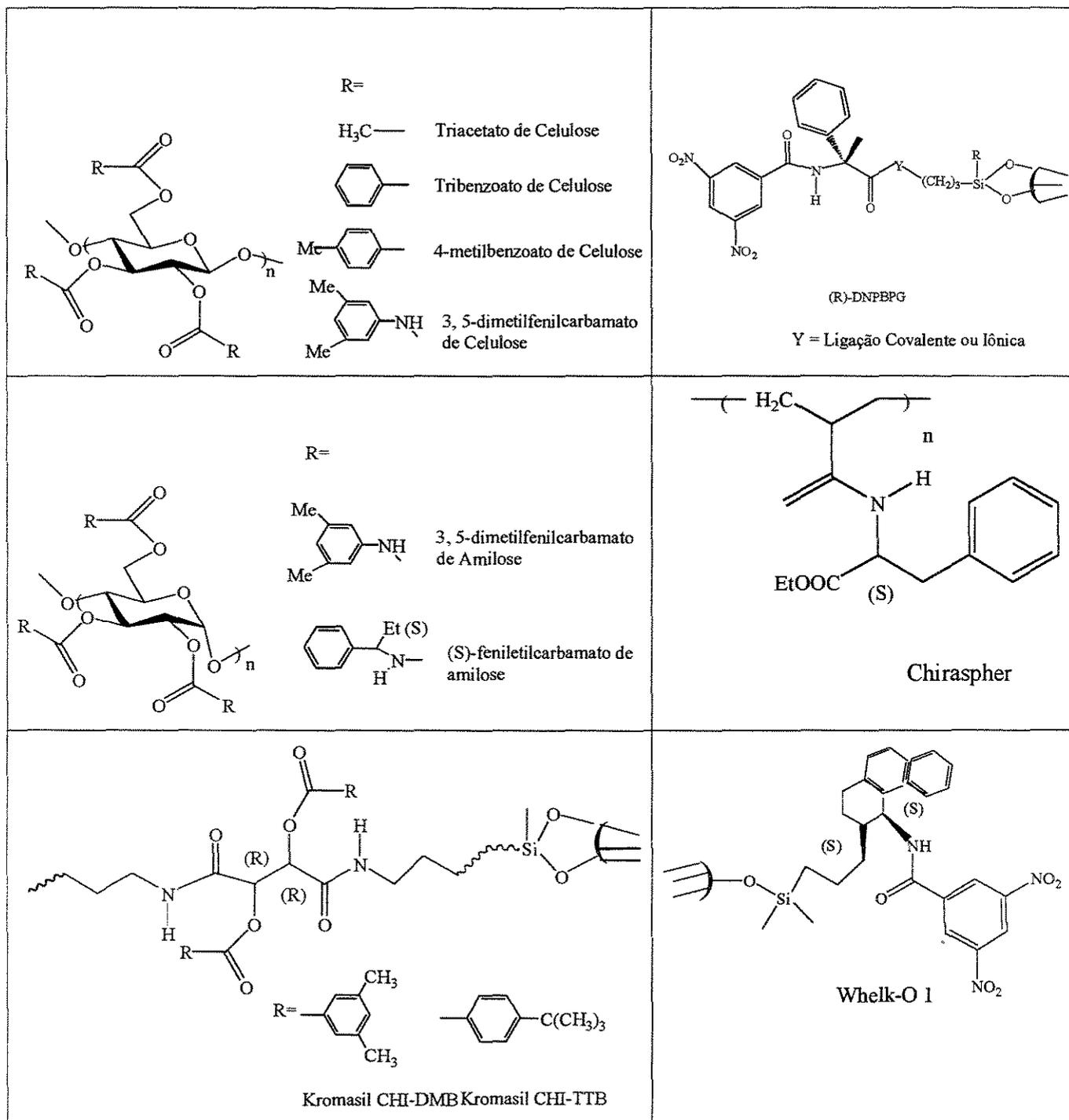


Figura 2.11: Estrutura química das FEQs mais utilizadas em separações preparativas disponíveis comercialmente (FRANCOTTE, 2001).

2.3.7.2 Fases estacionárias quirais baseadas em celulose

Entre as FEQs mais utilizadas, aquelas derivadas dos polissacarídeos celulose e amilose são extremamente populares e têm sido usadas em separações de até toneladas de racematos. Uma variedade de derivados celulósicos, tais como acetatos, benzoatos e fenilcarbamatos, têm sido explorados com esse propósito.

A fim de superar as limitações apresentadas pelos acetatos e benzoatos, uma família de FEQs baseadas em celulose e amilose derivatizadas têm sido produzidas (Figura 2.12).

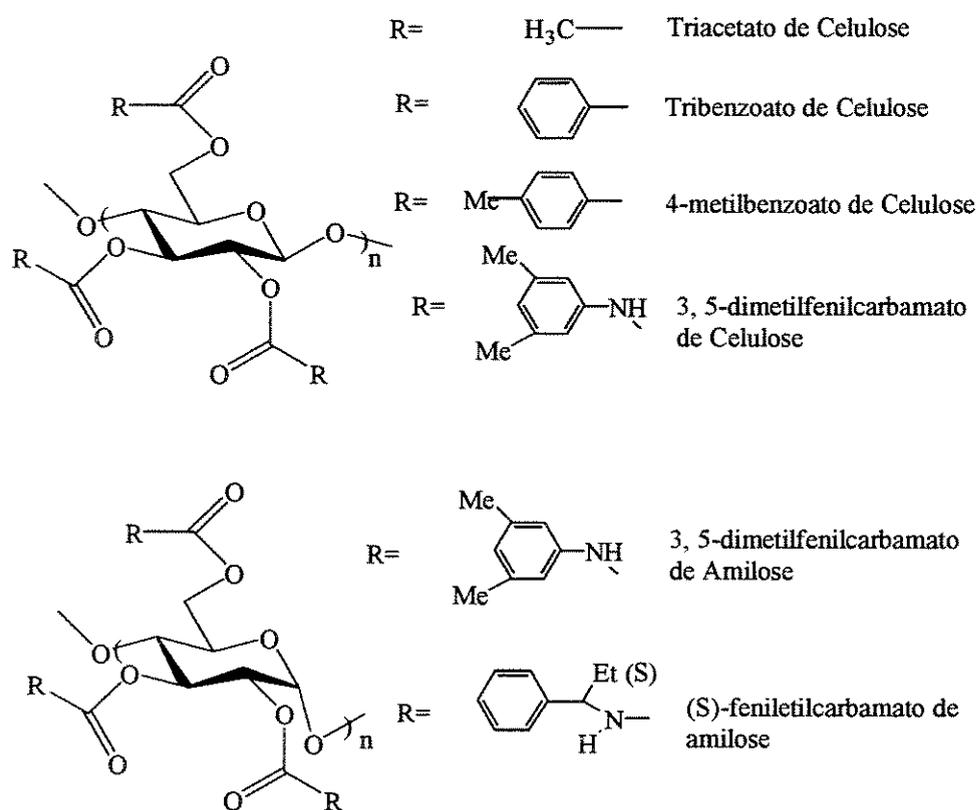


Figura 2.12: Fases estacionárias quirais baseadas em celulose e amilose (JUZA *et al.*, 2000).

Os trifenilcarbamatos são utilizados para separar misturas racêmicas polares e apresentam elevada sensibilidade quanto à geometria molecular do substrato

(DÄPPEN *et al.*, 1986). Estes polímeros não são covalentemente ligados ao suporte, mas adsorvidos sobre sílica gel macroporosa silanizada. Conseqüentemente, algumas precauções precisam ser observadas na escolha do solvente a ser utilizado como fase móvel junto as FEQs, que comumente operam em fase normal utilizando-se hexano como solvente (JUZA *et al.*, 2000).

2.3.8 Mecanismo de reconhecimento quiral dos fenilcarbamatos de polissacarídeos

A habilidade de reconhecimento quiral depende notadamente da natureza da unidade monossacarídica, da posição da ligação e do tipo de ligação. O mecanismo de reconhecimento quiral das FEQs baseadas em polissacarídeos tem sido exaustivamente pesquisada utilizando-se métodos cromatográficos. Esta abordagem fornece uma elevada quantidade de informações, principalmente parâmetros termodinâmicos sobre a interação entre os solutos e a FEQ que afetam sua resolução (PIRKLE & PORCHAPSKY, 1989).

Entretanto, a compreensão do mecanismo de reconhecimento quiral em um nível molecular envolve uma abordagem espectroscópica incluindo estudos de RMN combinados à modelagem computacional (OKAMOTO & YASHIMA, 1998; YASHIMA *et al.*, 1996).

A habilidade de reconhecimento quiral dos fenilcarbamatos de polissacarídeos é enormemente influenciada pelos substituintes da unidade fenila, uma vez que os mesmos modificam a polaridade dos grupos carbamatos. Isto sugere que o sítio adsortivo mais importante na discriminação quiral nos derivados fenilcarbamatos são os grupos carbamatos.

A Figuras 2.13 e 2.14 mostram a estrutura possível da fase estacionária quiral 3,5 dimetilfenil carbamato de celulose obtida por cálculos de mecânica molecular baseada na estrutura proposta pela difração de raio-X (VOGT & ZUGENMAYER, 1985) e seus possíveis sítios de interação.

Esta fase estacionária possui uma hélice tripla cruzada (3/2) à esquerda e os resíduos glicosídicos estão regularmente arranjados ao longo do eixo helicoidal. Um sulco helicoidal quiral com resíduos carbamatos polares existe ao longo da cadeia principal. Os grupos carbamatos polares estão muito bem localizados no seu interior e os grupos aromáticos hidrofóbicos no exterior da cadeia polimérica e, portanto, os enantiômeros que vem do exterior do sulco podem efetivamente interagir com o grupo carbamato polar via ligação de hidrogênio com os grupamentos NH e C=O e interações dipolo-dipolo do C=O (OKAMOTO *et al.*, 1986).

Além das interações polares, interações π - π entre os grupos fenilas da fase estacionária e do grupo aromático do soluto podem desempenhar um importante papel no mecanismo de reconhecimento, particularmente na separação cromatográfica em fase reversa.

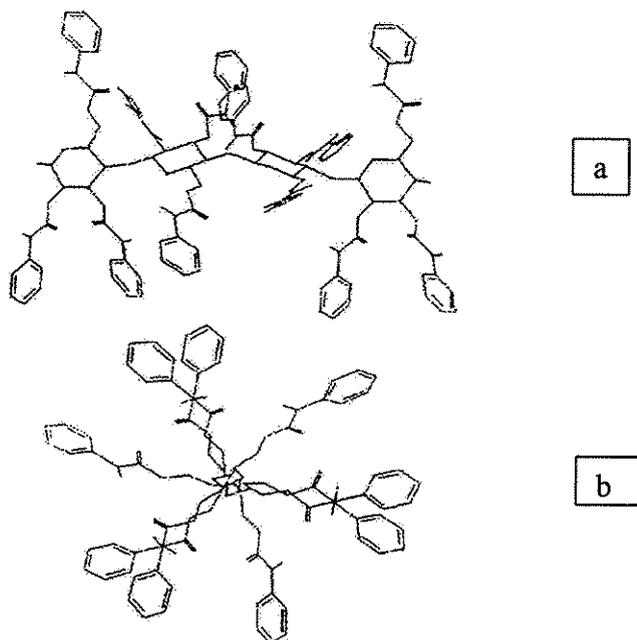


Figura 2.13: Estrutura do trisfenilcarbamato de celulose.
(a), ao longo do eixo X; (b), perpendicular ao eixo X (OKAMOTO *et al.*, 1988).

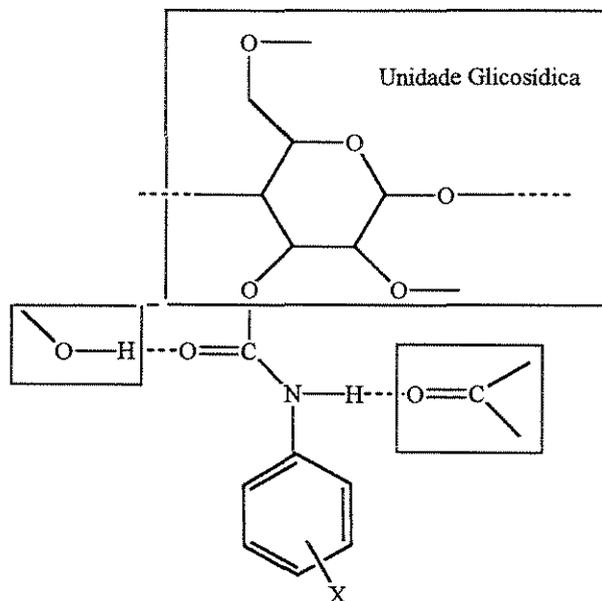


Figura 2.14: Interação esquemática dos racematos com o resíduo carbamato (OKAMOTO & KAIDA, 1994).

2.3.8.1 Fase móvel e a fase estacionária fenilcarbamato de celulose

Estas fases possuem uma considerável desvantagem, pois possuem um grau variado de solubilidade em muitos solventes orgânicos tais como: tetrahidrofurano, dioxano, tolueno, solventes clorados, acetato de etila, etc. Esta característica reduz consideravelmente a escolha da fase móvel, limitando, pois, a possibilidade de aumentar a seletividade, variar o tempo de retenção e aumentar a solubilidade do racemato. Entretanto, foi desenvolvido um processo que torna as fases estacionárias insolúveis (FRANCOTTE & ZHANG, 1995; FRANCOTTE, 1997). O processo consiste, basicamente, em um tratamento térmico ou fotoquímico da fase estacionária baseada em polissacarídeos normalmente adsorvidos (Figura 2.15).

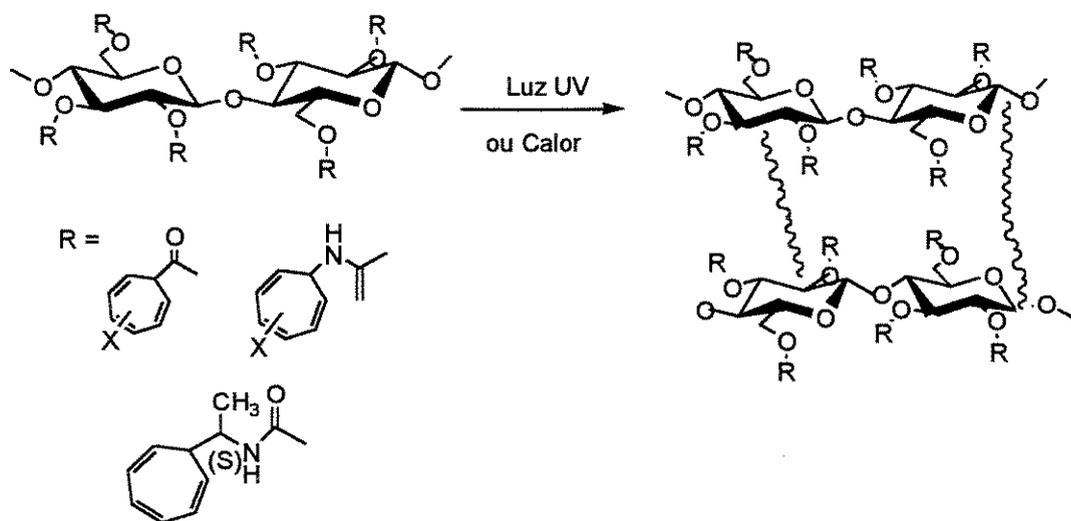


Figura 2.15: Processo de imobilização das FEQs baseadas em polissacarídeos de acordo com FRANCOTTE & ZHANG (1995), FRANCOTTE (1997).

Através da aplicação de um destes tratamentos, a imobilização ocorre por meio de ligações cruzadas das cadeias de polissacarídeos. Dependendo do grupo derivacional e do tipo de polissacarídeo, um dos tratamentos acima citados (fotoquímico ou térmico) pode ser o mais eficiente. Entretanto, o mecanismo exato de reação não está totalmente elucidado. Um grande número de derivados polissacarídeos tem sido preparado de acordo com estes novos tratamentos e seu poder de resolução quiral tem sido investigado. A imobilização permite a utilização de solventes capazes de melhorar o processo de separação sem que haja a dissolução da FEQ. A Figura 2.16 mostra as vantagens das novas fases imobilizadas baseadas em polissacarídeos (FRANCOTTE, 2001).

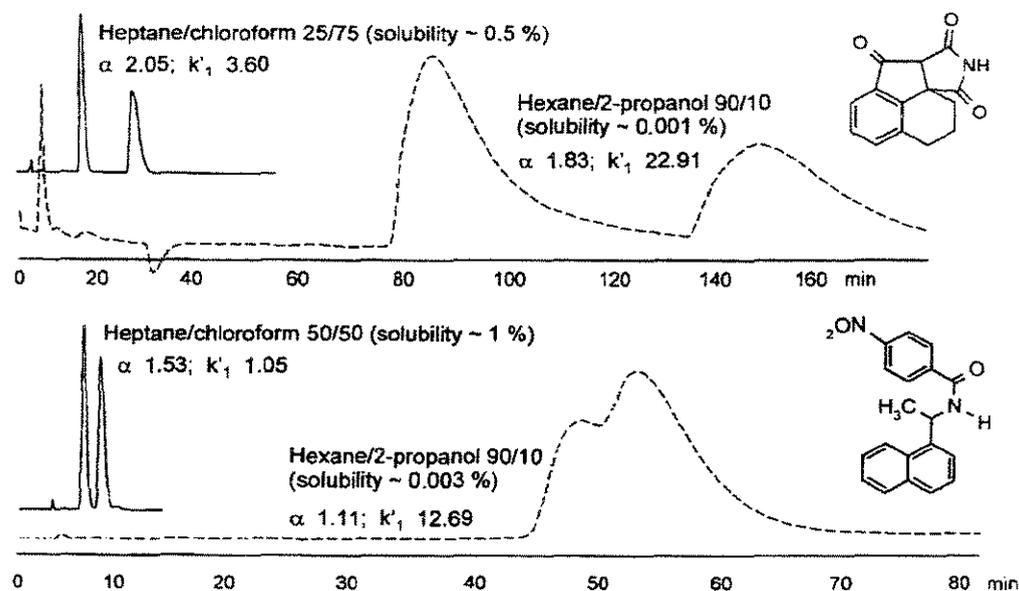


Figura 2.16: Separação cromatográfica de enantiômeros na tris(3,5-dimetilfenilcarbamato) de celulose adsorvida em sílica gel (7 μ m, 4000 Å) antes (---) e depois (—) da imobilização (coluna, 4 X 250 mm). a) Separação dos enantiômeros de um derivado imida cíclico. b) Separação dos enantiômeros do 1-nafitiletilamina para-nitrofenilamida (FRANCOTTE, 2001).

Observa-se que antes da imobilização ambos os racematos não foram muito bem separados (linha pontilhada). Após a imobilização verifica-se um aumento significativo do coeficiente de seletividade assim como uma melhor resolução dos picos para os dois enantiômeros (linha contínua).

2.4 O MÉTODO DA CROMATOGRAFIA EM PULSO

2.4.1 Introdução

Assim como em outros processos de separação, nos processos cromatográficos os fatores de equilíbrio termodinâmico, os quais governam as interações entre o soluto presente na fase móvel e a fase estacionária, e os fatores cinéticos, que contribuem para o transporte dos solutos através das fases móvel e estacionária, são importantes.

2.4.2 O Método da Cromatografia em Pulso

Nos processos cromatográficos utilizados para o estudo da adsorção, a fase estacionária é uma superfície ativa granular sólida. A escolha do adsorvente é baseada no tamanho da partícula, área superficial e atividade da superfície.

Os parâmetros de equilíbrio e cinética são determinados a partir das curvas cromatográficas obtidas, utilizando-se um modelo matemático adequado que corresponda aos dados experimentais. O modelo isotérmico de escoamento pistonado axialmente disperso é o que melhor representa o escoamento de um fluido através de um leito empacotado na região de Henry. Ele possui a vantagem de considerar os efeitos dispersivos na coluna que afetam a eficiência da separação, incluindo a dispersão axial e as resistências à transferência de massa. Cada tipo de resistência à transferência de massa é expresso por uma equação diferencial e suas correspondentes condições de contorno e inicial. A constante de equilíbrio e a difusividade podem ser calculadas a partir das soluções analíticas destas equações. Ambos os parâmetros também podem ser derivados diretamente da curva experimental obtida, através das medidas do tempo de retenção e da altura equivalente dos pratos teóricos (*HETP*).

2.4.2.1 Principais características de um pico cromatográfico

Para uma coluna de comprimento L , porosidade do leito ε , recheada com partículas de raio R_p , submetida a um pulso de vazão de adsorbato, no regime da lei de Henry e considerando a curva de resposta como uma gaussiana, é possível descrevê-la através de seus momentos estatísticos. Para uma gaussiana, existem apenas três momentos estatísticos (os momentos com graus superiores são iguais a zero):

O momento zero (μ_0) expressa a área da curva cromatográfica, obtida por integração e é muito utilizada em análise quantitativa.

O primeiro momento (μ) contém informações sobre a adsorção na coluna, e é calculado pela distância entre o início do cromatograma e o ponto máximo da curva, ou seja, o tempo de retenção (t_r) (VAN DEEMTER *et al.*, 1956).

$$\mu = \frac{\int_0^{\infty} ctdt}{\int_0^{\infty} cdt} = \lim_{s \rightarrow 0} \frac{\partial \bar{c}}{\partial s} \frac{1}{c_0} \quad (2.1)$$

O segundo momento da curva cromatográfica fornece informações sobre os parâmetros de resistência a transferência de massa e é indiretamente obtida pela largura da curva, ou variância, que é igual ao quadrado do desvio padrão da gaussiana (σ^2) (VAN DEEMTER *et al.*, 1956).

$$\sigma^2 = \frac{\int_0^{\infty} c(t - \mu)^2 dt}{\int_0^{\infty} cdt} = \lim_{s \rightarrow 0} \frac{\partial^2 \bar{c}}{\partial s^2} \frac{1}{c_0} - \mu^2 \quad (2.2)$$

A Figura 2.17 mostra uma representação de uma curva cromatográfica e os parâmetros obtidos. Onde w é a largura da banda cromatográfica.

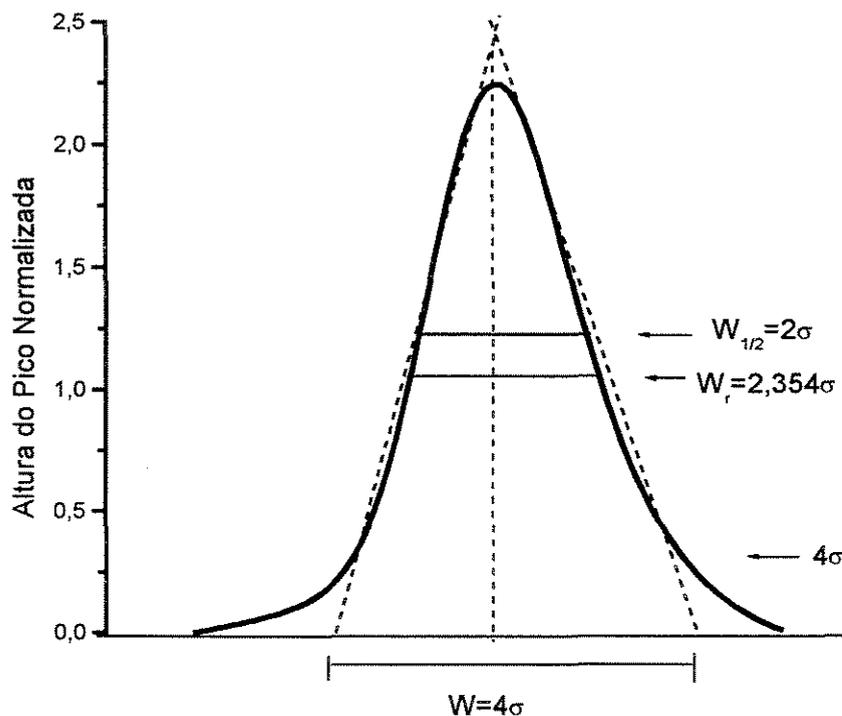


Figura 2.17: Representação de uma Curva Cromatográfica (SNYDER & KIRKLAND, 1974).

2.4.2.2 Altura equivalente de pratos teóricos

O poder de separação de um processo cromatográfico cresce à medida que os solutos fluem através do leito empacotado. Isto é devido ao maior número de vezes que as moléculas interagem entre as fases móvel e estacionária. Cada etapa na qual a molécula alcança o equilíbrio é equivalente a um “estágio de equilíbrio” ou “prato teórico”. O fator de separação entre dois componentes pode ser pequeno, mas com um número de pratos teóricos suficientes, qualquer resolução desejada

pode ser obtida. A grande vantagem de um processo cromatográfico é que muitos pratos teóricos podem estar contidos em uma coluna de comprimento moderado.

O *HETP* para uma coluna cromatográfica pode ser calculado aproximadamente pela equação de VAN DEEMTER (1956):

$$HETP = \frac{A_1}{v} + A_2 + A_3v \quad (2.3)$$

Onde:

$$A_1 = 1.4D_m$$

$$A_2 = 2R_p$$

$$A_3 = [2\varepsilon / (1 - \varepsilon)K_L H] / [1 + \varepsilon / (1 - \varepsilon)H]^2$$

Neste caso, a coluna é suficientemente longa, opera na região de Henry sob condições isotérmicas e a eficiência da separação é dependente da velocidade do fluido e da resistência à transferência de massa entre a fase fluida a fase adsorvida.

O *HETP* também pode ser definido como:

$$HETP = (L/N) \quad (2.4)$$

Onde L é o comprimento da coluna e N é o número de pratos teóricos.

É possível calcular este parâmetro a partir do 1º e 2º momento da cromatografia (VAN DER LAAN, 1958):

$$HETP = \frac{\sigma^2}{\mu^2} \cdot L = \frac{2D_L}{v} + \frac{2\varepsilon v}{(1 - \varepsilon)} \cdot \frac{1}{HK_L} \left[1 + \frac{\varepsilon}{(1 - \varepsilon)H} \right]^{-2} \quad (2.5)$$

Para se obter um maior número de pratos teóricos e, portanto, um processo de separação eficiente, um empacotamento uniforme é essencial. Isto requer um procedimento especial de empacotamento a fim de eliminar variações na porosidade do leito. Uma não uniformidade no empacotamento do leito pode levar a um aumento no *HETP*. A Figura 2.18 mostra os efeitos dos vários tipos de empacotamento no *HETP*.

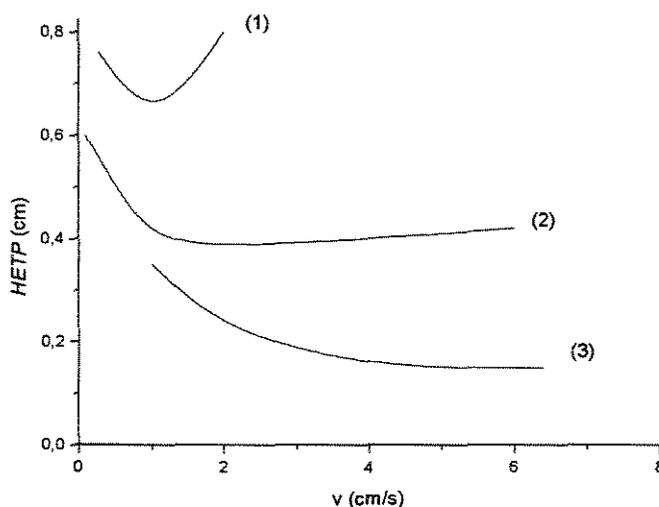


Figura 2.18: Efeito do empacotamento da coluna sobre o *HETP*.

1 – Empacotamento por simples adição de partículas na coluna; 2 – Empacotamento por acréscimo + vibração; 3 – Empacotamento por acréscimo + vibração + choques controlados (RUTHVEN, 1984).

O *HETP* fornece uma interpretação física simples dos efeitos da dispersão axial e resistência à transferência de massa sobre o desempenho da coluna.

2.4.2.3 O tempo de retenção

Em uma coluna cromatográfica, os componentes de uma amostra migram através do leito em velocidades diferentes e eluem separadamente em tempos

diferentes. Uma vez que o soluto move-se apenas quando está dissolvido na fase móvel, a distribuição das suas moléculas entre as fases móvel e estacionária determina a velocidade média de migração do mesmo. Todas as formas de cromatografia são, portanto, processos de separação de migração diferencial onde os componentes da amostra são seletivamente retidos em graus diferentes pela fase estacionária.

O termo t_r pode ser medido diretamente pelo experimento e é definido como o tempo necessário para a amostra fluir através do leito, desde o momento em que é injetada até o instante em que é detectada pelo sistema de detecção. O t_r corresponde ao 1º momento da resposta cromatográfica μ .

2.4.3 Parâmetros que Afetam a Eficiência da Coluna Cromatográfica

2.4.3.1 Efeitos de dispersão axial

Quando um fluido escoar através de um leito empacotado há uma tendência a dispersão através da coluna na direção axial da mesma. Qualquer efeito de dispersão axial é indesejável, uma vez que reduz a eficiência da separação. A minimização deste efeito é, portanto, o maior objetivo do projetista, principalmente quando o fator de separação é pequeno (RUTHVEN, 1984).

No modelo isotérmico pistonado axialmente disperso assume-se uma velocidade média uniforme do fluido através do leito em qualquer seção da coluna, mas com algum gradiente de concentração ao longo do eixo.

Para sistemas fluidos em geral, a dispersão axial cresce com o aumento da difusividade molecular e o escoamento turbulento do fluido através da coluna. Em sistemas líquidos, o coeficiente de dispersão axial é diretamente proporcional à velocidade do fluido (RUTHVEN, 1984).

2.4.3.2 Efeitos de resistência à transferência de massa

Em uma coluna empacotada com partículas quirais, notadamente aquelas suportadas em sílica porosa, há duas principais resistências à transferência de massa: difusão do adsorbato no interior das partículas e a formação do filme externo que circunda a partícula (DUAN *et al.*, 1998).

Em um leito empacotado, é impossível para as moléculas moverem-se no interior das partículas em uma linha reta sem colidirem com a superfície das mesmas. As moléculas seguem um caminho tortuoso no interior dos poros que constituem a partícula (RUTHVEN, 1984).

Na adsorção em fase líquida, o solvente circunda cada partícula formando um filme no qual ocorre a transferência de massa por difusão molecular. A vazão do solvente é quem determina a espessura do filme. Se a espessura for muito larga, a resistência à transferência de massa devido a esta etapa se tornará dominante e controlará a taxa geral de adsorção (RUTHVEN, 1984).

2.4.4 Modelagem Matemática do Leito Fixo de Adsorção

Para analisar e interpretar os dados de um experimento cromatográfico é necessário um modelo matemático. Os parâmetros que caracterizam o equilíbrio e a cinética de um processo adsorptivo podem ser obtidos a partir da correlação dos pontos experimentais com um modelo matemático adequado.

No presente trabalho, serão feitas algumas considerações:

- Equilíbrio linear (região de Henry);
- Difusão de Fick no interior dos poros;
- Perfil de concentração uniforme na direção radial. Em virtude do pequeno diâmetro da coluna em comparação ao comprimento da coluna é possível fazer esta suposição;

- Processo isotérmico.

2.4.4.1 Desenvolvimento do Modelo

O modelo matemático mais simples para descrever o processo em coluna de leito fixo, assume processo isotérmico, com escoamento pistonado e axialmente disperso:

$$-D_L \frac{\partial^2 c}{\partial z^2} + v \frac{\partial c}{\partial z} + \frac{\partial c}{\partial t} + \left(\frac{1-\varepsilon}{\varepsilon} \right) \frac{\partial \bar{q}}{\partial t} = 0 \quad (2.6)$$

Onde: c é a concentração do fluido ao longo da direção z , q é a concentração média no interior do adsorvente, ε é a porosidade do leito de adsorção e D_L é o coeficiente de dispersão axial no interior da coluna.

O balanço de massa no interior do adsorvente é dado por:

$$\frac{\partial q}{\partial t} = f(q, c) \quad (2.7)$$

A resposta dinâmica da coluna de adsorção é, portanto, dada pela solução simultânea, na forma $c(z, t)$ e $q(z, t)$, sujeitas as condições de contorno impostas à coluna.

2.4.4.2 Modelo Matemático da Adsorção em Leito Fixo

O modelo empregado (KÄRGER & RUTHVEN, 1992) foi o de força motriz linear, com a resistência devida à transferência de massa, representada em um único coeficiente K_L , conforme a equação a seguir:

$$\varepsilon_i \frac{\partial c_i}{\partial t} = K_L \frac{3}{R_p} (c_e - c_i) - \rho_s (1 - \varepsilon_i) \frac{dq}{dt} \quad (2.8)$$

com $\partial q / \partial t$ dado por:

$$\frac{\partial q}{\partial t} = \sum_{i=1}^{NC} \frac{\partial f_{eq}(c_i)}{\partial c_i} \frac{\partial c_i}{\partial t} \quad (2.9)$$

O equilíbrio foi representado pela forma monocomponente da equação de Henry:

$$f_{eq}(c_i) = H c_i \quad (2.10)$$

As condições iniciais e de contorno foram:

$$u c_e^F = u c_e - \varepsilon_e D_L \left. \frac{\partial c_e}{\partial z} \right|_0 \quad z=0, \quad t > 0 \quad (2.11)$$

Onde $c_e^F = \delta(t)$

$$\left. \frac{\partial c_e}{\partial z} \right|_L = 0 \quad z = L, \quad t > 0 \quad (2.12)$$

$$c_e(z, 0) = c_{e,0}(z) \quad t = 0, \quad z > 0 \quad (2.13)$$

$$c_i(z, 0) = c_{i,0}(z) \quad t = 0, \quad z > 0 \quad (2.14)$$

$$q_j(z, 0) = q_{j,0}(z) \quad t = 0, \quad z = 0 \quad (2.15)$$

2.4.4.3 Soluções

A resolução numérica dessas equações assim como suas condições de contorno e inicial, para determinação da difusividade e da constante de adsorção, não é possível sem o uso de uma rotina computacional e foram revisadas por KUCERA (1965). Uma alternativa é correlacionar os momentos derivados de uma análise cromatográfica com as soluções do modelo matemático proposto. HAYNES E SARMA (1973) foram os primeiros a derivar uma expressão para o primeiro e o segundo momento de uma resposta cromatográfica em termos da dispersão axial e dos parâmetros de transferência de massa.

O tempo de retenção também pode ser expresso da seguinte maneira:

$$\mu = \frac{\int_0^{\infty} ct dt}{\int_0^{\infty} c dt} = \frac{L}{\varepsilon v} [\varepsilon + (1 - \varepsilon)H] \quad (2.16)$$

E a relação entre o Primeiro e o Segundo Momento fornecerá o *HETP*:

$$HETP = \frac{\sigma^2}{\mu^2} \cdot L = \frac{2D_L}{v} + \frac{2u}{(1 - \varepsilon)} \cdot \frac{1}{HK_L} \left[1 + \frac{\varepsilon}{(1 - \varepsilon)H} \right]^2 \quad (2.5)$$

$$\frac{1}{HK_L} = \frac{R_p}{3k_f} + \frac{R_p^2}{15\varepsilon_p D_p} + \frac{r_c^2}{15HD_c} \quad (2.17)$$

O primeiro termo do lado direito da expressão refere-se à resistência a transferência de massa devido à formação de filme externo a partícula; o segundo termo refere-se à difusão no poro e o terceiro a difusão no microporo.

A importância do termo referente à formação do filme externo à partícula a resistência à transferência de massa pode ser avaliado pelo *(Bi)_m* escrito em termos do número de Sherwood:

$$(Bi)_m = \frac{Sh D_m}{6 \varepsilon_p D_p} \quad (2.18)$$

Para $Sh \geq 2$ e $D_p \leq D_m/\tau$, o $(Bi)_m$ assume o seu valor mínimo dado por:

$$(Bi)_m = \frac{\tau}{3\varepsilon_p} \quad (2.19)$$

Sob estas condições o gradiente de concentração interno é apreciavelmente maior que o gradiente externo. Qualquer resistência adicional à transferência de massa decrescerá sensivelmente o D_p . Desta forma a resistência à transferência de massa no interior da partícula é mais importante do que aquela associada à formação de filme externo a partícula na taxa de transferência de massa (RUTHVEN, 1984).

Para leitos empacotados, WAKAO e FUNAZKRI (1978) sugeriram a seguinte correlação que é válida em uma ampla faixa de Re :

$$Sh = 2,0 + 1,1Re^{\frac{2}{3}} Sc^{-0,3} \quad (2.20)$$

Uma vez que a velocidade do fluido é muito pequena, Re também é muito pequeno e o número de Sh se aproxima de 2. Assim o termo referente à formação de filme foi negligenciado no cálculo do K_L .

A sílica utilizada neste trabalho como suporte do tris(3,5-dimetilfenilcarbamato de celulose) é um material mesoporoso, assim o termo referente a difusão no microporo também foi negligenciado. Portanto, apenas o segundo termo da equação 2.17 tem uma importância significativa no cálculo do K_L .

2.4 A TECNOLOGIA DO LEITO MÓVEL SIMULADO (LMS)

2.5.1 Introdução

Para a separação de enantiômeros em escala laboratorial o método cromatográfico é o mais empregado, rápido e eficiente.

Em separações em larga escala duas opções tecnológicas são empregadas: Cromatografia em batelada (FRANCOTTE, 1996B; DINGENEN & KINKEL, 1994) e a cromatografia em Leito Móvel Simulado (JUZA *et al.*, 2000).

Na última década, a enantioseparação pela tecnologia do leito móvel simulado (LMS) vem ganhando importância. Esta tecnologia caracteriza-se por explorar o mesmo método cromatográfico analítico (*HPLC*), incluindo as mesmas fases estacionária e móvel, mas com uma produtividade maior que a da cromatografia tradicional. Além disso, a tecnologia do LMS pode ser utilizada na separação em todos os estágios do processo de desenvolvimento do medicamento.

O LMS opera sob condições de saturação, levando a um comportamento de adsorção competitiva não-linear. Comparada à cromatografia preparativa em batelada, a tecnologia do LMS possui muitas vantagens. No LMS, toda a fase estacionária é utilizada para promover a separação, enquanto na cromatografia em batelada apenas uma pequena seção do leito está envolvida a cada instante; o que permite um aumento na produtividade quanto à utilização da FEQ. Além disso, o processo é contínuo e o consumo de solvente é reduzido consideravelmente.

Um pré-requisito essencial para o aumento de escala de uma separação quiral analítica é a disponibilização da FEQ em elevadas quantidades e baixo custo. Além disso, outros fatores também influem no aumento de escala, tais como: estabilidade química, que limitará o número de fases móveis compatíveis e, indiretamente, a solubilidade máxima do soluto; estabilidade mecânica, a qual é particularmente importante em cromatografia líquida de alta resolução (*HPLC*),

que utiliza pequenas partículas como recheio às quais são impostas elevadas perdas de carga, e o tempo de vida útil. Todos estes fatores devem ser considerados na seleção de uma fase estacionária quirál para uma separação específica utilizando-se a tecnologia do LMS (JUZA *et al.*, 2000). A maioria das separações quirais reportada utilizando-se o LMS menciona o uso de fases estacionárias baseadas em polissacarídeos em virtude da sua elevada capacidade (FRANCOTTE, 2001).

2.5.2 A Tecnologia do Leito Móvel Simulado

A operação de uma unidade LMS pode ser facilmente compreendida através do conceito de cromatografia de eluição contínua em batelada. Considere uma única coluna cromatográfica e dois adsorbatos que possuem afinidades diferentes pela fase estacionária. Caso um pulso desta mistura seja alimentado a esta coluna e a mesma seja suficientemente longa, os dois componentes ao final da eluição serão separados.

O mesmo princípio pode ser aplicado à cromatografia em contra-corrente que se constitui no Leito Móvel Verdadeiro (LMV). Neste caso, as partículas sólidas (adsorventes) fluem ao longo da coluna contracorrente a corrente fluida. Desta forma, as espécies podem ser alimentadas pelo meio da coluna e separadas nas suas extremidades (refinado e extrato) (Figura 2.19).

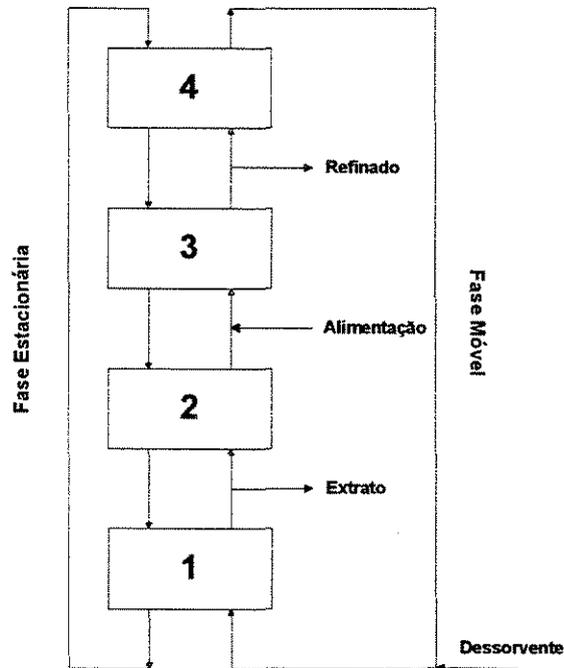


Figura 2.19: Esquema do Leito Móvel Verdadeiro (LMV) (PAIS *et al.*, 1997).

Entretanto, o movimento das partículas adsorventes causa problemas resultantes do atrito e mistura das mesmas. Portanto, na prática a movimentação do leito é simulada através do uso de leitos fixos adsorventes (colunas cromatográficas) movimentando-se periodicamente as saídas e entradas da unidade na mesma direção de escoamento do fluido.

O LMS constitui-se em quatro secções: entrada de dessorvente, alimentação, saída do extrato e saída do refinado. A movimentação do leito é simulada através do uso de uma válvula de troca; que em tempos determinados realiza a mudança das portas de entrada e saída destas sessões na direção de escoamento do fluido (Figura 2.20).

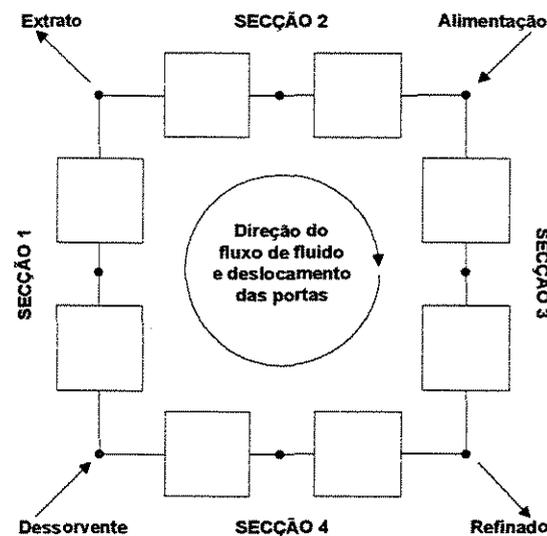


Figura 2.20 Esquema do Leito Móvel Simulado (LMS) (JUZA *et al.*, 2000).

2.5.2.1 Determinação das condições de operação do LMS

Os sistemas de LMS são unidades complexas, cuja operação requer a escolha de alguns parâmetros, tais como: tempo de troca, vazões das quatro seções e concentração e composição na alimentação dos componentes a serem separados. Estes parâmetros devem ser determinados para cada processo de separação a fim de se estabelecer algumas especificações, tais como: pureza do produto, produtividade e recuperação mínima das espécies a serem separadas (CHARTON & NICOUD, 1995; JUZA *et al.*, 1998).

Esta complexidade pode ser atenuada de duas formas. A primeira é baseada no uso de um modelo detalhado da unidade LMS e subseqüente simulações numéricas. O modelo matemático de um sistema LMS compreende a modelagem das colunas para cada seção do LMS, acoplado a equações de balanço de massa em cada nó da unidade (MIGLIORINI *et al.*, 1999). Além disso, o tempo de troca, t^* , tem que ser implementado. A modelagem das colunas segue as mesmas condições sugeridas para leitos cromatográficos, descritos no capítulo 2.4. item 2.4.4.

O segundo método é mais utilizado e consiste numa versão simplificada do modelo proposto para leitos cromatográficos. É conhecida como a “modelo da teoria de equilíbrio”, no qual a dispersão axial e o coeficiente de resistência à transferência de massa são negligenciados, assumindo-se, pois, eficiência infinita da coluna. Este modelo leva à “teoria do triângulo”, onde o desempenho de separação é controlado pela razão entre volume de líquido e de sólido, m_j , para cada secção da unidade LMS. A Equação 2.21 define o termo m_j

$$m_j = \frac{u_j t^* - \varepsilon L}{(1 - \varepsilon)L} \quad j = 1, \dots, 4 \quad (2.21)$$

A teoria do triângulo possibilita calcular as condições ótimas para se obter a separação completa de dois adsorbatos. Estas condições definem a região de separação (que tem a forma de um triângulo), no qual todos os parâmetros operacionais são agrupados pelas vazões nas seções centrais da unidade (m_2 e m_3). As condições de contorno desta região são fornecidas por relações explícitas definidas em termo dos parâmetros isotérmicos e da composição da alimentação. As três regiões vizinhas possuem regimes de separação diferentes, nas quais tanto o extrato (Ex) como o refinado (Re) é puro, ou ambos os componentes se distribuem em duas correntes de produto. O vértice do triângulo representa a condição de operação ótima em termos do desempenho da separação (JUZA *et al.*, 2000).

A teoria do triângulo é conhecida como uma das ferramentas mais eficientes para se operar o LMS. Pode ser utilizada de duas maneiras: (1) explicar resultados experimentais (FRANCOTTE & RICHERT, 1997) e (2) estabelecer condições de operação ótimas (PEDEFERRI *et al.*, 1999; BIRESSI *et al.*, 2000). Em ambos os casos faz-se necessário o conhecimento das isoterms de adsorção dos compostos a serem separados. A Figura 2.21 mostra um diagrama geral de separação na unidade LMS.

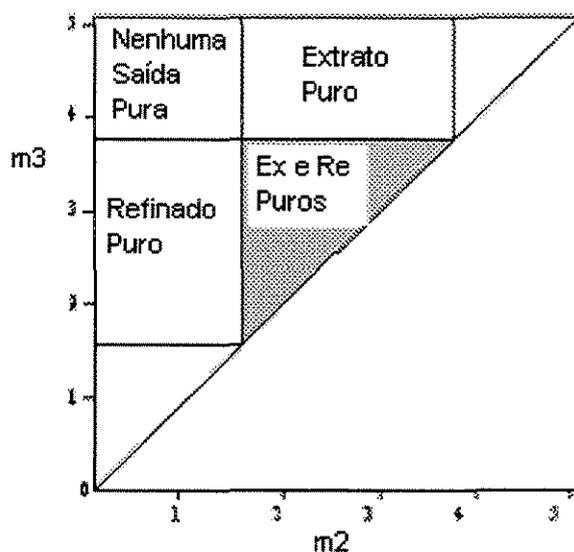


Figura 2.21: Diagrama geral de separação completa na unidade LMS para sistemas diluídos. A área em cinza é a região na qual as correntes de extrato e refinado são puras (MAZZOTTI *et al.*, 1997).

A aplicação da teoria do triângulo no projeto das condições de operação e otimização de novas separações tem sido bem exemplificado (NAGAMATSU *et al.*, 1999; PEDEFERRI *et al.*, 1999). Utilizando-se o modelo descrito no capítulo 2.4 para colunas empacotadas, que considera os efeitos da não idealidade (resistência à transferência de massa e dispersão axial), os quais foram negligenciados pela teoria do triângulo, é possível verificar que a região de completa separação torna-se menor à medida que a eficiência das colunas diminui (MIGLIORINI *et al.*, 1999). Este fato já era esperado uma vez que ambos os fenômenos citados desfavorecem a separação. Entretanto, a presença de efeitos da não idealidade não inviabiliza a utilização da teoria do triângulo; uma vez que as informações obtidas com o triângulo idealizado fornecem uma aproximação do comportamento real do LMS (JUZA *et al.*, 2000). A Figura 2.22 mostra um diagrama geral de separação completa na unidade LMS sob condições não ideais.

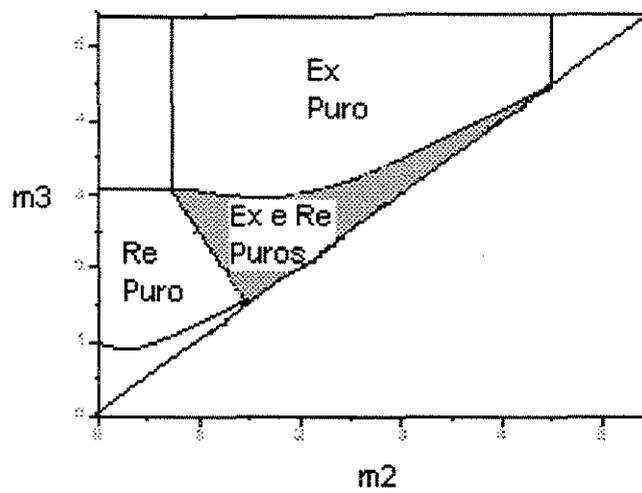


Figura 2.22: Diagrama geral de separação completa na unidade LMS sob condições não ideais. A área em cinza é a região na qual as correntes de extrato e refinado são puras (MAZZOTTI *et al.*, 1997).

PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

Este trabalho foi dividido em três etapas:

1. Síntese da Fase Estacionária Quiral (FEQ);
2. Corridas Cromatográficas em leito fixo para determinação de parâmetros cinéticos e termodinâmicos dos enantiômeros da mistura racêmica, assim como as constantes de Henry das oito colunas que compõem o sistema LMS;
3. Separação dos enantiômeros no sistema LMS.

A primeira parte consistiu na síntese em escala de dezenas de gramas e posterior caracterização da FEQ. Foram realizadas análises químicas e físicas a fim de determinar suas propriedades e assegurar seu bom desempenho na separação da mistura racêmica.

Na segunda parte foram realizados experimentos a fim de se estudar o comportamento termodinâmico e cinético da FEQ sintetizada. Com esse propósito foram utilizadas colunas cromatográficas analíticas de tamanhos variados empacotadas com a tris(3,5 dimetilfenilcarbamato de celulose) suportada em sílica. Também foi realizado experimento na região linear para a determinação das constantes de Henry das oito colunas que foram utilizadas na unidade LMS.

Na terceira parte do trabalho foram realizadas as corridas experimentais na unidade LMS montada no laboratório de Biosseparações da Faculdade de Engenharia Química da UNICAMP, para a separação da mistura racêmica do *N*-Boc-Rolipram. Este fármaco foi sintetizado no Instituto de Química (IQ) da UNICAMP e gentilmente fornecido para a realização deste trabalho.

3.1 Síntese da Fase Estacionária Quiral

O método experimental empregado seguiu o método de CASS *et al.* (1999) acrescido de algumas modificações.

3.1.1 Síntese do tris(3,5-dimetilfenil carbamato) de celulose

Piridina da marca VETEC (Brasil) anidra foi adicionada ao polissacarídeo celulose adquirido da MERCK (Alemanha), previamente seco em estufa a vácuo a 60°C por 24 horas. A proporção foi de 50 mL de piridina para cada grama do sólido. A mistura reacional foi aquecida a 100°C sob agitação. Depois de 24 horas a mistura foi resfriada à temperatura ambiente e adicionada ao isocianato 3,5-dimetilfenil adquirido pela Aldrich (EUA), permanecendo a reação sob aquecimento e agitação por mais 72 horas a 100°C. Após o resfriamento da reação à temperatura ambiente, o produto foi precipitado sob agitação em metanol da marca NUCLEAR (Brasil). A mistura foi mantida em agitação durante 1 hora e o produto, branco, foi filtrado a vácuo em funil de placa sinterizada e lavado com metanol até não mais se observar resíduos de carbamatos secundários (solução límpida no interior do kitasato). O carbamato foi seco em sistema a vácuo por 24 horas.

No procedimento sugerido por CASS (1999) o carbamato é seco por 24 horas em estufa a vácuo a 60°C. No entanto, verificou-se que a etapa de aquecimento era desnecessária uma vez que apenas o vácuo era suficiente para secar o carbamato.

3.1.2 Cobertura dos carbamatos ao suporte *APS-Nucleosil*

Foram colocadas 2,4g de sílica *APS-Nucleosil* (10 μm) adquirida da Labtrom (Brasil) em um balão especial para deposição da sílica (balão de vidro ondulado Figura 3.1). Adicionou-se 44,4 mL de tetrahydrofurano (THF) da marca Synt (Brasil) e a suspensão foi deixado sob refluxo por 30 min.

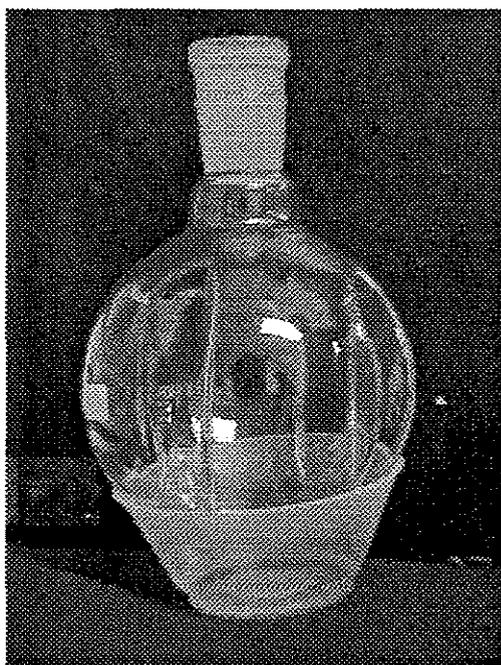


Figura 3.1: Balão de vidro ondulado especial para revestimento

Após o resfriamento desta mistura à temperatura ambiente, o carbamato (0,6 g) foi solubilizado em uma mistura contendo 6,25 mL de THF, 5 mL de Diclorometano e 0,6 mL de *N N*-dimetilacetamida (Synt) e adicionada ao balão contendo a sílica *APS Nucleosil*. Todos os reagentes empregados nesta etapa foram adquiridos da Synt (Brasil).

Os solventes foram evaporados lentamente em rota-vapor. O produto seco foi peneirado cuidadosamente em uma peneira especial de orifício de 38 μm , para a uniformização do tamanho das partículas.

No procedimento sugerido por CASS (1999), a FEQ é aquecida, após a etapa de evaporação dos solventes em rota-vapor, por 24 horas em estufa a vácuo a 60°C. No entanto, verificou-se que a etapa de aquecimento era desnecessária uma vez que apenas o vácuo era suficiente para secar a FEQ e eliminar qualquer resíduo de solvente.

3.1.3 Empacotamento da coluna quirral

A fase estacionária quirral foi suspensa em uma mistura de hexano grau HPLC adquirido da MALINCKRODT (EUA), e isopropanol grau HPLC adquirido da J.T. BAKER (EUA), em proporção 50:50 v/v e agitada em sonicador por 3 minutos. A suspensão formada foi deixada em repouso por 10 minutos até a decantação das partículas com tamanho superior a 5µm. O sobrenadante foi descartado e a suspensão viscosa foi adicionada ao sistema de empacotamento. O empacotamento em coluna de aço inoxidável foi realizado sob pressão da ordem de 510 atm (7500 psi), utilizando-se uma mistura de hexano e isopropanol, na proporção de 80:20 v/v, como solvente.

Após o empacotamento, a coluna foi mantida em fluxo contínuo em uma mistura de hexano e isopropanol a uma proporção de 90:10 v/v por 12 horas, utilizando-se um fluxo de 0,5 mL/min.

3.2 Caracterização da FEQ

Nesta etapa do trabalho foram realizadas análises físicas e químicas para caracterizar a sílica utilizada como suporte, o tris(3,5 dimetilfenilcarbamato de celulose) – DMFCC - e a FEQ.

3.2.1 Caracterização da sílica APS-Nucleosil

Para a caracterização da sílica que seria utilizada como suporte foram realizados experimentos para a determinação do tamanho de partícula e tamanho do poro. A determinação do tamanho de partícula foi realizada através da técnica de espalhamento da luz laser (*light scattering*) em um aparelho Mastersize S, modelo S-MAM 5005 da Malvern. A determinação do tamanho de Poro foi realizada por meio da técnica de adsorção de N₂ (BET) em um equipamento Gemini 2375.

Realizou-se micrografia da sílica APS-Nucleosil em um microscópio eletrônico de varredura (MEV) da marca LEICA LEO 440i a fim de se ter uma idéia do formato da partícula.

3.2.2 Caracterização do tris(3, 5 dimetilfenilcarbamato de celulose)

O tris(3,5 dimetilfenilcarbamato de celulose) foi submetido a análise no Infravermelho em um equipamento Nicoletti 460 com o objetivo de verificar o aparecimento de bandas referentes aos grupos N-H, C≡N, C=O.

Realizou-se análise CHN (carbono, hidrogênio e nitrogênio) em um equipamento analisador PE 2400 e os valores experimentais encontrados foram comparados com os valores calculados previstos para a amostra em estudo.

3.2.3 Caracterização da FEQ

Foram realizadas análises para a determinação da granulometria da FEQ através da técnica de espalhamento da luz laser (*light scattering*) em um aparelho Mastersize S, modelo S-MAM 5005 da Malvern.

A análise química da FEQ foi realizada através de um espectrômetro *EDX* (Dispersão de Energia de Raio-X) que se constitui em um acessório do MEV (Microscópio Eletrônico de Varredura). O equipamento emite um feixe de elétrons e calcula através das transições eletrônicas ocorridas o tipo e a percentagem de átomos presentes em uma amostra.

Micrografias da FEQ sintetizadas foram realizadas com o objetivo de visualizar a adsorção do DMFCC na sílica *APS-Nucleosil*.

Realizaram-se ainda análises *TGA* e *DSC* em equipamento Shimadzu 50 (Japão) a fim de se verificar a estabilidade térmica e os possíveis fenômenos ocasionados quando da elevação da temperatura sobre a FEQ sintetizada.

3.3 Corridas cromatográficas em fase líquida

3.3.1 Materiais e equipamentos

Neste estudo foi utilizado um cromatógrafo Waters, conectado a um detector de índice de refração da mesma marca, que por sua vez era acoplado a um microcomputador que monitorava a resposta de saída da coluna cromatográfica através de um *software* específico para o modelo Waters.

Nos experimentos para determinação dos parâmetros cinéticos e termodinâmicos as colunas cromatográficas utilizadas consistiram de tubos de aço inoxidável de tamanhos variados (de 15 e 25 cm de comprimento e 0,45 cm de diâmetro interno), cujas paredes internas foram polidas a fim de aumentar a eficiência do empacotamento.

Nos experimentos realizados para a caracterização das oito colunas que fariam parte da unidade foram utilizados tubos de aço inoxidável (20 cm de comprimento e 0,78 cm diâmetro interno marca PHENOMENEX) cujas paredes foram polidas internamente.

Em ambos os conjuntos de colunas, discos de níquel sinterizados foram inseridos em ambas as extremidades da coluna a fim de conter as partículas do adsorvente quirál no interior da mesma.

Alguns experimentos preliminares foram realizados para a determinação das condições de operação do leito (faixa de vazão adequada ao experimento), assim como o volume morto do sistema, necessário à análise dos dados de equilíbrio e cinética.

Nos experimentos realizados para a determinação dos parâmetros termodinâmicos e cinéticos do racemato *N*-Boc-Rolipram, o solvente utilizado foi uma mistura de hexano adquirido da MALINCKRODT (EUA) e isopropanol adquirido da J.T. BAKER (EUA), na proporção 90:10 v/v.

Na determinação do volume morto do sistema e outros parâmetros que caracterizam o leito foi utilizado etanol adquirido da J.T. BAKER (EUA) como solvente e o 1, 3, 5 tri-*terc*-butilbenzeno (TTBB) fornecido pela Aldrich (EUA) como adsorbato.

O 1,3,5 TTBB tem sido amplamente utilizado como adsorbato para a determinação do tempo morto no interior das colunas contendo fases estacionárias quirais derivadas de celulose e amilose (CHING, 1989). Em virtude da sua não interação com a fase estacionária e seu pequeno tamanho este composto não é retido pela FEQ e foi utilizado para determinação da porosidade total da coluna.

3.3.2 A cromatografia em pulso

Uma corrida cromatográfica típica consiste na injeção, em uma coluna cromatográfica previamente saturada com a fase móvel e pré-estabilizada (pressão e sinal do detector estáveis), de um pulso de adsorbato na fase móvel a um fluxo e temperatura preestabelecidos. A concentração efluente é monitorada por um sistema de aquisição de dados. Para cada curva, o primeiro e o segundo momento são calculados.

O primeiro momento é então plotado contra L/u e o *HETP* contra a velocidade superficial u . Caso a faixa dos pontos adquirida esteja na região de Henry, ambos os gráficos deverão produzir retas. A constante de equilíbrio é encontrada de acordo com a relação expressa na Equação 2.16.

O *HETP* é encontrado a partir da relação entre o quadrado do primeiro momento e o segundo momento de acordo com a Equação. 2.5.

3.3.2.1 Método de análise para uma resposta cromatográfica

Para uma resposta cromatográfica, o primeiro momento (μ) corresponde ao tempo de retenção, que pode ser definido como o tempo que uma molécula gasta para fluir do ponto de injeção até o ponto de detecção. O segundo momento corresponde à variância (σ) do pico, que caracteriza a sua largura (FOGLER, 1992).

Calcula-se μ da seguinte forma:

1. Constrói-se a curva $C \times t$ (concentração versus tempo);
2. Calcula-se a área sob a curva $C \times t$,
3. Divide-se C pelo valor da integral da curva $C \times t$, obtendo-se a curva $E(t)$ (função distribuição tempo de residência),
4. Constrói-se a curva $E(t) \times t$ (tempo de residência versus tempo)
5. μ ou t_m corresponde a integral da curva $tE(t) \times t$

No cálculo do σ^2 , procede-se da seguinte maneira:

1. Constrói-se a curva $tE(t) \times t$ (tempo vezes a função distribuição tempo de residência versus tempo)
2. Calcula-se a área sob a curva $tE(t) \times t$, obtendo-se t_m ou μ (tempo de residência médio)

3. Constrói-se, então, a curva $(t-t_m)^2 E(t) \times t$.
4. σ^2 será obtido através da integral da curva $(t-t_m)^2 E(t) \times t$

3.3.2.2 Correções para o volume morto

O volume morto corresponde ao volume de líquido presente no sistema entre o injetor e o detector, exceto a coluna, incluindo-se as linhas, o sistema de injeção e a célula do detector. Correções para o volume morto podem ser muito importantes em sistemas líquidos. É necessário conhecer o erro devido ao volume morto para encontrar o tempo de retenção (μ_{coluna}) e variância (σ^2_{coluna}) corretos para se calcular a constante de equilíbrio e a difusividade.

O tempo de retenção medido corresponde ao tempo requerido pelo adsorbato para fluir do sistema de injeção à célula do detector. Isto pode ser considerado como a soma do tempo gasto pelo adsorbato fluindo através da coluna e através do volume morto. Portanto, para um determinado fluxo, o tempo de retenção medido μ_{medido} pode ser expresso da seguinte forma:

$$\mu_{medido} = \mu_{coluna} + \mu_{volume\ morto} \quad (3.1)$$

O tempo de retenção devido ao volume morto pode ser calculado através do volume morto, V , e a vazão, Q :

$$\mu_{volume\ morto} = (V/Q) \quad (3.2)$$

E assim a Equação 3.1 pode ser reescrita da seguinte forma:

$$\mu_{medido} = \mu_{coluna} + (V/Q) \quad (3.3)$$

Da mesma forma, o segundo momento pode ser determinado da seguinte maneira:

$$\sigma^2_{\text{medido}} = \sigma^2_{\text{coluna}} + \sigma^2_{\text{volume morto}} \quad (3.4)$$

3.3.3 Parâmetros determinados experimentalmente

3.3.3.1 Volume morto

Para o cálculo do volume morto procede-se da seguinte forma:

1. Remove-se a coluna do Sistema Experimental,
2. Conectam-se os tubos que fazem a ligação da coluna ao *HPLC* um ao outro,
3. Mede-se o 1º e o 2º momentos dos picos obtidos em diferentes vazões.

Estes momentos correspondem àqueles utilizados para corrigir os valores experimentais obtido com a coluna acoplada ao *HPLC*. A partir do 1º momento calcula-se o volume morto da seguinte forma:

$$V_{\text{volume morto}} = Q \cdot t_r \quad (3.5)$$

onde, t_r é o tempo de retenção e Q a vazão.

3.3.3.2 Porosidades do leito, total e da partícula

A definição usual de tempo de retenção zero em cromatografia é fornecida pela Equação 3.6

$$t_{oR} = \frac{\varepsilon_T L}{u} \quad (3.6)$$

onde u e L são a velocidade superficial e o comprimento da coluna respectivamente, e ε_T é a porosidade total da coluna. Na determinação da porosidade total injetou-se o 1,3,5 TTBB na coluna e através da Equação 3.6 calculou-se ε_T .

No cálculo da porosidade do leito, a seguinte correlação foi utilizada neste trabalho, sugerida por RUTHVEN (1984) e SUZUKI (1990):

$$\varepsilon_T = 0,45 + 0.55\varepsilon \quad (3.7)$$

onde ε é a porosidade do leito.

A porosidade da partícula foi calculada a partir da Equação 3.8:

$$\varepsilon_p = \frac{(\varepsilon_T - \varepsilon)}{(1 - \varepsilon)} \quad (3.8)$$

3.3.3.3 Coeficiente de dispersão axial

Na modelagem cromatográfica, os fenômenos que contribuem para a mistura axial são incluídos em um único coeficiente de dispersão axial. Os dois principais mecanismos que contribuem para a dispersão axial são a difusão molecular e a difusão turbilhonar (GUIOCHON *et al.*, 1994). Em uma primeira aproximação, estas contribuições são aditivas, e o coeficiente de dispersão axial D_L é dado pela Equação 3.9:

$$D_L = \gamma_1 D_m + \gamma_2 d_p u \quad (3.9)$$

onde d_p é o diâmetro da partícula, D_m é a difusividade molecular e γ_1 e γ_2 são constantes geométricas, cujos valores são aproximadamente 0,7 e 0,5, respectivamente (GUIOCHON, 1994).

No modelo utilizado os efeitos de todos os mecanismos que contribuem para a mistura axial foram incluídos em um único coeficiente de dispersão axial calculado de acordo com a Equação 3.9. Em fase líquida, a difusividade molecular é muito pequena para contribuir de maneira significativa no coeficiente de dispersão axial, principalmente em números de Reynolds muito baixos (RUTHVEN, 1984). Portanto, o termo que se refere à difusividade molecular pode ser negligenciado. A Equação 3.9 pode ser reduzida a seguinte forma:

$$D_L = \gamma_2 d_p u = \lambda u \quad (3.10)$$

Combinando as Equações 2.5 e 3.10, obtém-se:

$$HETP = 2\lambda + 2u \left(\frac{1-\varepsilon}{\varepsilon} \right) \frac{H}{K_L} \left[1 + \left(\frac{1-\varepsilon}{\varepsilon} \right) H \right]^{-2} \quad (3.11)$$

Onde λ é definido de acordo com a Equação 3.12:

$$\lambda = \frac{2D_L}{v} \quad (3.12)$$

3.3.3.4 Determinação dos parâmetros de Gibbs-Helmhotz

Foram realizados experimentos para analisar a influência da temperatura sobre o fator de seletividade (α). Mudanças de temperatura influenciam diferenciadamente no processo de interação dos enantiômeros do *N*-Boc-Rolipram com a FEQ sintetizada. Este fato pode ser mais bem compreendido através dos parâmetros de Gibbs-Helmhotz - $\Delta_{(S,R)} \Delta H^\circ$ e $\Delta_{(S,R)} \Delta S^\circ$ - para os racematos do *N*-

Boc-Rolipram. Estes parâmetros podem ser calculados através do Gráfico de $\ln \alpha$ x $1/T$ de acordo com a Equação 3.13:

$$\ln \alpha = -\left(\frac{\Delta_{S,R}\Delta H^\circ}{RT}\right) + \left(\frac{\Delta_{S,R}\Delta S^\circ}{R}\right) \quad (3.13)$$

3.4 Determinação experimental da isoterma de adsorção competitiva

O método empregado seguiu procedimento descrito por PAIS *et al.* (1998). Consiste em uma combinação de medidas estáticas de adsorção-dessorção confrontadas com um método dinâmico de cromatografia frontal (curvas de adsorção-dessorção).

No método de adsorção-dessorção, a coluna cromatográfica inicialmente equilibrada com o eluente composto pela mistura de hexano e isopropanol na proporção 90:10 v/v, foi equilibrada com soluções de concentrações conhecidas e variadas da mistura racêmica n-boc-Rolipram até a saturação. A coluna em seguida, foi completamente desorvida com o eluente. O volume eluído resultante da etapa de desorção foi analisado. Através do balanço de massa expresso pela Equação 3.14 é possível calcular a concentração de cada componente retido na partícula, q_i^* , em equilíbrio com a concentração da alimentação, c_i^F . É importante ressaltar que q_i^* compreende a concentração do adsorbato na fase adsorvida mais aquela presente no fluido no interior dos poros.

$$V^d c_i^d = \varepsilon V_c c_i^F + (1 - \varepsilon) V_c q_i^* \quad 3.14$$

onde: V^d é o Volume eluído; c_i^d é a concentração, no equilíbrio, de cada componente no volume eluído na etapa de dessorção; ε é a porosidade do leito; V_c é o volume da coluna; c_i^F é a concentração de cada componente na alimentação e q_i^* é a concentração total, no equilíbrio, de cada componente retido no interior das partículas.

Este procedimento fornece um ponto da isoterma de adsorção para cada componente (c_i^F , q_i^*). A determinação completa da isoterma de adsorção requer um conjunto de experimentos utilizando diferentes concentrações na alimentação.

No levantamento da isoterma à temperatura de 25°C foram utilizadas misturas do racemato *N*-Boc-rolipram nas seguintes concentrações: 1,2,5,8,10 mg/mL. A fase móvel empregada consistiu em uma mistura de solventes: hexano adquirido da MALINCKRODT (EUA), e isopropanol adquirido da J.T.Baker (EUA), ambos grau *HPLC*, na proporção 90:10 v/v. Foram realizados levantamentos das curvas de adsorção-dessorção nas concentrações de 1 e 10 mg/mL.

3.5 Corridas experimentais no sistema de Leito Móvel Simulado

A unidade LMS consiste de oito colunas de aço inox (20 cm de comprimento e 0,78 cm diâmetro interno) conectadas em série através de tubulações de aço inox cujo diâmetro interno é de 0,16 cm (1/16”).

O esquema da unidade é mostrado na Figura 3.2 onde cada retângulo representa uma coluna e cada duas colunas seqüenciadas representam uma secção do leito móvel simulado. Assim, de acordo com a Figura 3.2 as colunas 1 e 2 representam a secção 1 da unidade, as colunas 3 e 4 a segunda secção e assim por diante.

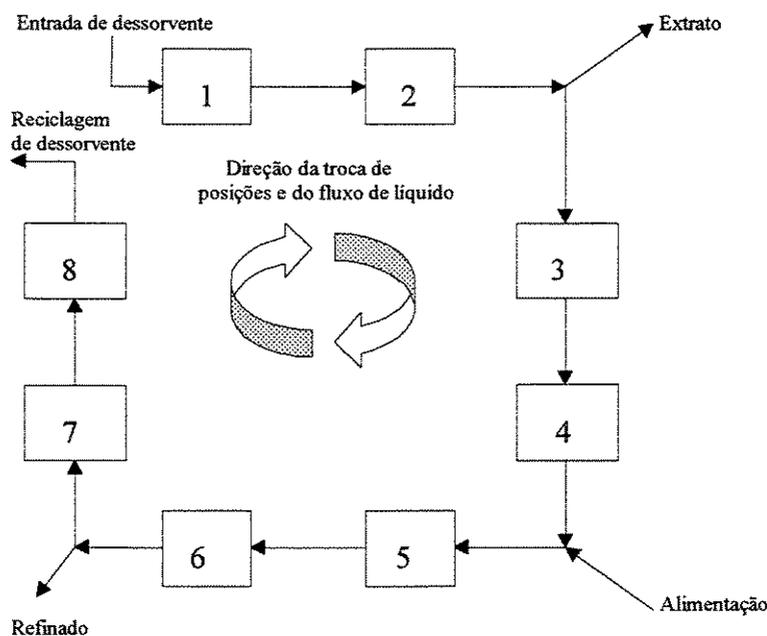


Figura 3.2: Esquema da unidade LMS

A mudança de um passo na posição das correntes implica na alternância das secções da unidade LMS. Desta forma, a secção 1 passa a ser definida pelas colunas 3 e 4, a secção 2 pelas colunas 5 e 6 e assim por diante. A troca das posições das correntes de alimentação, entrada de dessorvente, extrato, refinado e saída de dessorvente, é realizada por cinco válvulas multiposição. Cada uma dessas correntes, exceto a última citada, é conectada a uma bomba de *HPLC*.

As válvulas são elétricas e o controle das mesmas é realizado por meio de um *software* próprio para a operação desta unidade

A quantificação da pureza das correntes de saída é necessária à avaliação do desempenho da separação. A concentração total nas correntes de Refinado e Extrato é determinada através de um espectrofotômetro UV / VISÍVEL, e a diferença entre as concentrações dos enantiômeros nas correntes de Refinado e Extrato é determinada por um polarímetro. Ambos os medidores possuem células de fluxo, são conectados em série à unidade LMS e operam em linha com a mesma. Conhecendo-se a soma e a diferença das concentrações das correntes de

Refinado e Extrato, ambas podem ser facilmente calculadas (ZENONI *et al.*, 2000).

A Figura 3.3 mostra um esquema detalhado da unidade LMS montado no Laboratório de Propriedades Coloidais e Reológicas da FEQ / UNICAMP, coordenado pelo Dr César Santana, no qual se realizou este trabalho.

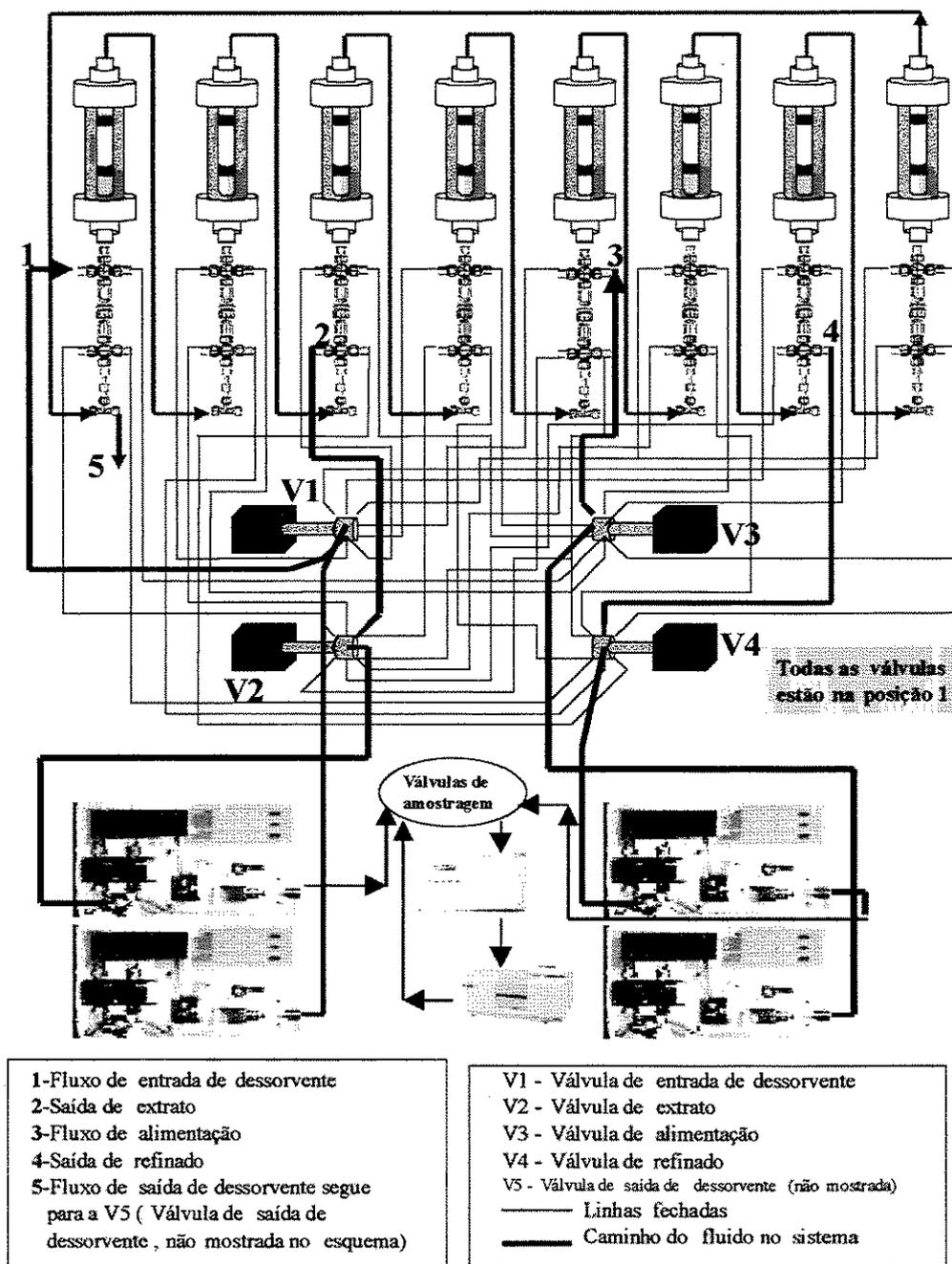


Figura 3.3 Desenho detalhado da unidade de Leito Móvel Simulado

3.5.1 Caracterização do leito de adsorção

O método adotado para caracterizar o leito adsorativo das oito colunas e determinar parâmetros, tais como porosidade e coeficiente de dispersão axial, seguiu o procedimento descrito na secção 3.3.3.

3.5.2 Determinação das isotermas lineares

A fim de se operar a unidade LMS com sucesso, é necessário conhecer o fator de separação dos enantiômeros de interesse no adsorvente utilizado. Esta informação pode ser obtida a partir da medida das suas isotermas lineares e conseqüente determinação das constantes de Henry.

As constantes de Henry podem ser determinadas pela medida do tempo de retenção sob condições lineares, ou seja, diluições infinitas. Nestas condições não há competição entre os solutos e o cromatograma do racemato fornecerá as mesmas informações do cromatograma do enantiômero puro.

Na determinação das constantes de Henry da 8 colunas da Unidade LMS o solvente utilizado consistiu em uma mistura de hexano a 95% adquirido da MALINCKRODT (EUA), e isopropanol, adquirido da J.T. BAKER (EUA), na proporção de 70:30 v/v. A mistura racêmica injetada consistiu em uma solução do *N*-Boc-Rolipram, a uma concentração de 1 mg/mL a 25°C.

A relação entre as isotermas lineares e as condições operacionais da unidade, necessárias à separação dos enantiômeros pode ser resumida nas restrições dadas pelas Equações 3.15 a 3.17 (JUZA *et al.*, 2000) :

$$m_1 > H_R \quad (3.15)$$

$$H_S < m_2 < m_3 < H_R \quad (3.16)$$

$$m_4 < H_S \quad (3.17)$$

onde H_R e H_S são as constantes de Henry dos enantiômeros, e os parâmetros m_j são as razões entre volumes de líquido e de sólido em cada secção j da unidade LMS, dados pela Equação 3.18 (PEDEFERRI *et al.*, 2000) :

$$m_j = \frac{Q_j^{LMS} t^* - V \cdot \varepsilon^* - V_m}{V \cdot (1 - \varepsilon^*)} \quad (3.18)$$

onde Q_j^{LMS} é a vazão volumétrica de líquido na secção j da unidade LMS e t^* é o tempo de troca das posições das correntes.

As restrições impostas pelas Equações 3.15-3.17 levam à construção de um gráfico (Figura 3.4), determinado pelas constantes de Henry, que define a região de completa separação no plano $m_2 - m_3$. A escolha de um ponto (m_2, m_3) nesta região leva à definição de um conjunto de condições operacionais (vazões nas bombas e tempo de troca t^*) adequado à separação enantiomérica.

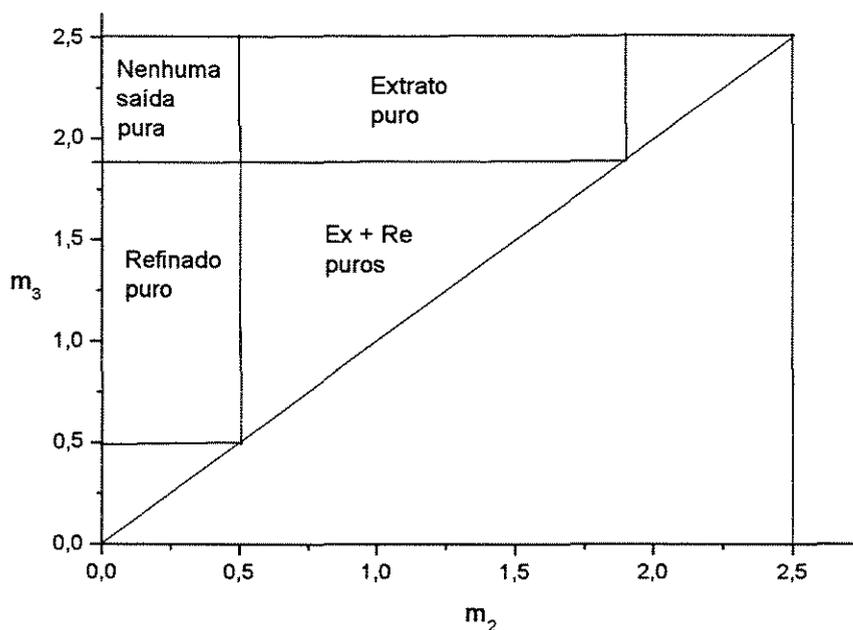


Figura 3.4: Região de separação completa do Rolipram em *MCTA* a 25°C

3.5.3 Procedimento para se projetar as condições operacionais da unidade LMS a partir das isothermas lineares

Os parâmetros operacionais do leito foram escolhidos baseados na teoria do triângulo, construído a partir das isothermas lineares e nas limitações físicas impostas à unidade, tais como: perda de carga no interior das colunas, pressão máxima suportada pelas válvulas de troca, limite de concentração mínimo para a detecção correta no polarímetro (em concentrações abaixo de 2,5 g/L, o sinal confunde-se com ruído), e tempo de troca igual ou superior a 10 minutos a fim de evitar o desgaste das válvulas.

Primeiro escolhe-se um ponto no interior do triângulo (\overline{m}_2 e \overline{m}_3) e arbitra-se valores para \overline{m}_1 e \overline{m}_4 que satisfaçam as restrições descritas pelas Equações 3.13 - 3.15. Em seguida, escolhe-se um valor para o tempo de troca (t^*) e para a vazão da alimentação (F). Os parâmetros Q_1 , Q_2 , Q_3 e Q_4 são calculados a partir da Equação 3.17. A partir do balanço de massa global da Unidade LMS, descrito pela Equação 3.19 e do balanço de massa para cada secção da unidade, descrito pelas Equações 3.20 - 3.23, é possível encontrar as vazões de Extrato (Ex), Refinado (Re), Dessorvente de saída ($D_{saída}$) e Dessorvente de entrada (D_{ent}).

$$D_{ent} + F = Ex + Re + D_{saída} \quad (3.19)$$

$$Q_1 = D_{ent} \quad (3.20)$$

$$Q_4 = D_{saída} \quad (3.21)$$

$$Ex = D_{ent} - Q_2 \quad (3.22)$$

$$Re = Q_3 - D_{saída} \quad (3.23)$$

O volume morto da unidade LMS foi determinado seguindo procedimento descrito na secção 3.3.3.1 com algumas modificações. Retirou-se uma coluna do sistema juntamente com todas as tubulações envolvidas (entrada e saída) e conectaram-se estas tubulações ao *HPLC*. O volume morto determinado foi multiplicado por oito (correspondente as oito colunas) e o valor encontrado igual 1,5 mL.

A fim de se ter uma idéia da dinâmica de separação no interior da unidade LMS faz-se uma análise do perfil interno de cada uma das colunas durante todo um ciclo. Preferencialmente, este procedimento é realizado, a partir do instante em que a unidade alcançou o estado estacionário, por meio de uma válvula de coleta acoplada a unidade na coluna 1. As frações coletadas são posteriormente analisadas por cromatografia de alta eficiência.

3.5.4 Análise das correntes de saída

As correntes de saída eram monitoradas pelo sistema de detecção composto pelo UV/Visível e pelo polarímetro. Através desse sistema era possível acompanhar o processo de separação de uma das correntes até o estado estacionário ser atingido. Neste trabalho foi monitorada apenas a corrente de saída do refinado, uma vez que era a corrente no qual saía o *R*-Boc-Rolipram (enantiômero de interesse).

A análise das correntes de Extrato e Refinado para a determinação da pureza e do excesso enantiomérico (e.e), parâmetros definidos pelas Equações 3.24-3.27, foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência. Uma coluna quiral analítica (0,45 x 25 cm) empacotada com a FEQ sintetizada foi utilizada para a análise das correntes sob as seguintes condições: mistura de hexano e Isopropanol na proporção de 90:10 v/v como fase móvel, a uma temperatura de 25°C e absorvância de 270 nm.

$$P_{Ex} = \frac{100.(c_B)_{Ex}}{(c_A)_{Ex} + (c_B)_{Ex}} \quad (3.24)$$

$$P_{Re} = \frac{100.(c_A)_{Re f}}{(c_A)_{Re f} + (c_B)_{Re f}} \quad (3.25)$$

Por sua definição, a pureza enantiomérica só pode variar dentro da faixa de 50 a 100% , sendo que o limite inferior corresponde a mistura racêmica ($c_A=c_B$, nas Equações 3.24 e 3.25), e o superior corresponde ao enantiômero puro ($c_B = 0$, na Equação 3.24, e $c_a = 0$, na Equação 3.25). Isso significa que um processo de separação enantiomérico ineficiente, que sequer altere a composição do racêmico, no final apresentará resultados de 50% de pureza, dando a impressão (errônea) de que se atingiu 50% do objetivo de separação (SANTOS, 2004).

Por essa razão, faz-se necessário definir um outro parâmetro que estabeleça o real desempenho do processo de separação. Este parâmetro, conhecido como excesso enantiomérico (e.e), varia de 0 a 100%, limites que correspondem à mistura racêmica e ao enantiômero puro, respectivamente. Para um sistema qualquer as Equações 3.26 e 3.27 descrevem este parâmetro para as correntes de extrato e refinado, respectivamente.

$$e.e_{Re} = \frac{(c_A - c_B)}{(c_A + c_B)}.100 \quad (3.26)$$

$$e.e_{Ex} = \frac{(c_B - c_A)}{(c_B + c_A)}.100 \quad (3.27)$$

onde: c_A é o componente menos retido na coluna de análise e c_B é o componente mais retido na coluna de análise

3.5.5 Determinação de outros parâmetros de desempenho da unidade LMS

Outros parâmetros são definidos a fim de avaliar o desempenho da unidade LMS em comparação com outros processos de separação de misturas racêmicas tais como a produtividade, a taxa de racêmico e o consumo de dessorvente descritos pelas Equações 3.28, 3.29 e 3.30, respectivamente.

$$\textit{Produtividade}_{\textit{por volume de feq}} = \frac{\textit{Taxa}_{\textit{racêmico}}}{[n.V.(1-\varepsilon)]} \quad (3.28)$$

$$\textit{Taxa}_{\textit{racêmico}} = c_F \cdot F \quad (3.29)$$

$$\textit{Consumo de Dessorvente} = \frac{(D_{\textit{ent}} + F - D_{\textit{saida}})}{F \cdot c_F} \quad (3.30)$$

onde: c_F é a concentração total da alimentação, n é o número de colunas da unidade LMS, V é o volume da coluna e ε é a porosidade do leito.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A FEQ tris(3,5 dimetilfenilcarbamato de celulose) suportada em sílica foi sintetizada em escala de dezena de gramas e caracterizada quanto às suas propriedades físicas e químicas.

Com a FEQ sintetizada, algumas colunas analíticas de tamanhos variados foram empacotadas. Com estas colunas, experimentos de adsorção para avaliar o desempenho da FEQ sintetizada foram realizados. Parâmetros de equilíbrio e cinéticos foram determinados quanto à separação do racemato *N*-Boc-Rolipram.

Realizaram-se ainda corridas cromatográficas contínuas utilizando uma unidade de separação LMS. À unidade foi acoplado um conjunto de oito colunas confeccionadas e empacotadas com a FEQ sintetizada. As corridas cromatográficas na unidade LMS consistiram de experimentos realizados apenas na região linear. Toda a dinâmica de separação ocorrida no sistema LMS foi acompanhada e parâmetros de desempenho relacionados à separação do *N*-Boc-Rolipram foram determinados.

4.1 Síntese e caracterização da fase estacionária quiral tris(3,5 dimetilfenilcarbamato de celulose) suportada em sílica

Realizou-se uma caracterização prévia da sílica utilizada. A análise física constituiu-se na determinação do tamanho de partícula e tamanho de poro cujos resultados são apresentados na Figura 4.1:

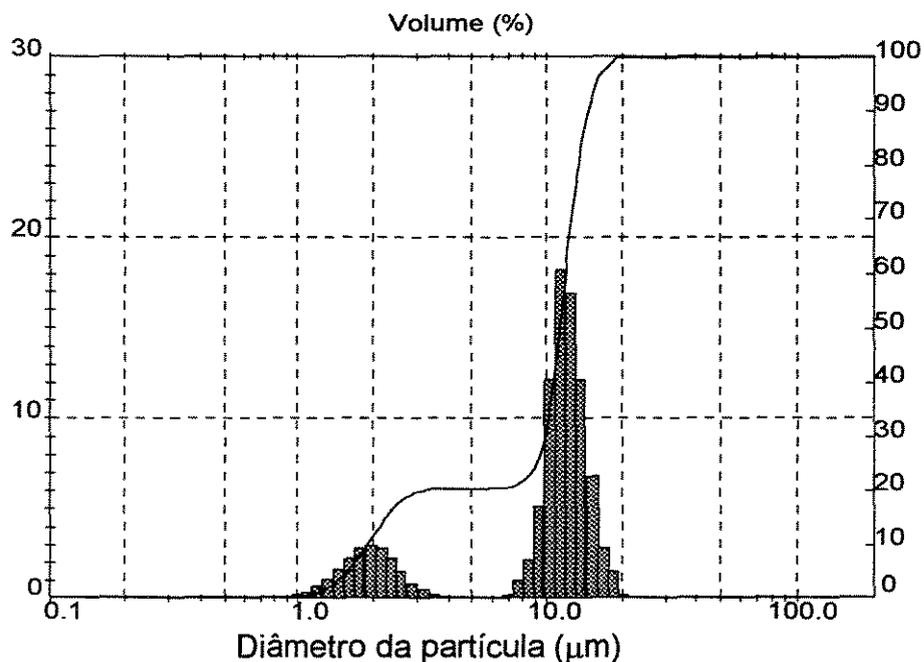


Figura 4.1: Distribuição do tamanho de partícula da sílica APS- Nucleosil.

A amostra utilizada apresenta duas distribuições de tamanho 20% possui aproximadamente 2 µm (partículas finas) e 80% aproximadamente 10 µm. Considerando-se apenas os 80% da amostra, as partículas possuem um tamanho médio de 11,67 µm.

A determinação do tamanho de poro foi realizada por meio da técnica de adsorção de N₂ (BET). Os resultados obtidos são apresentados nas Figuras 4.2 e 4.3 respectivamente.

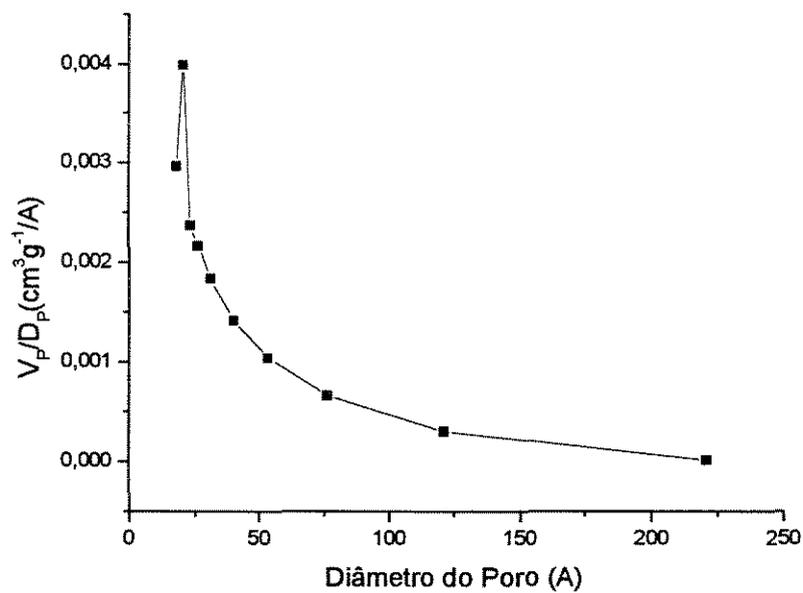


Figura 4.2: Distribuição do tamanho de poro da sílica APS-Nucleosil.

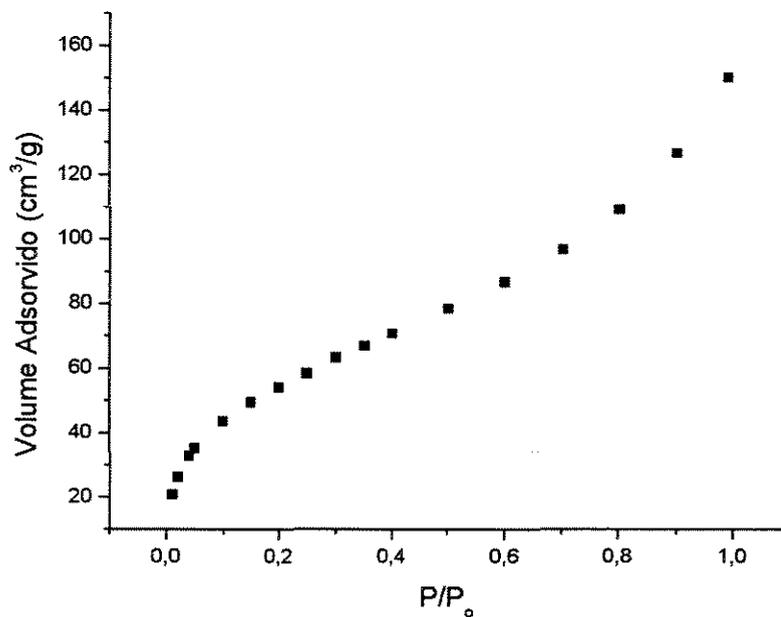


Figura 4.3: Isoterma de adsorção da sílica APS-Nucleosil.

A amostra apresenta Isoterma BET tipo II, ou seja, presença majoritária de mesoporos (diâmetro variando entre 25 e 120 Å). A área da superfície determinada foi de 202,11 m²/g e volume de poro de aproximadamente de 0,23 cm³/g. A amostra de sílica utilizada, portanto constitui-se em uma partícula pequena, de elevada área superficial indicando uma elevada capacidade de adsorção.

A síntese do composto tris(3,5 – dimetilfenilcarbamato de celulose) mostrado na Figura 4.4 apresentou rendimento superior a 95 %.

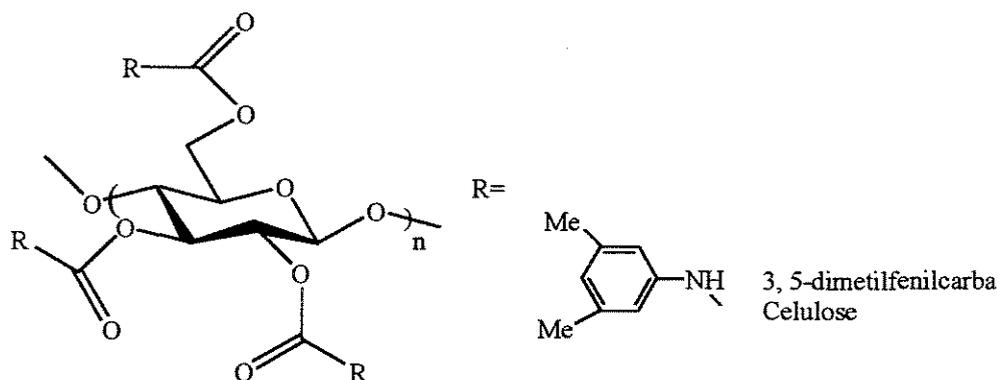


Figura 4.4: Estrutura do derivado celulósico DMFCC (ZHANG & FRANCOLTE, 1995).

O produto foi submetido à análise CHN e os resultados são mostrados na Tabela 4.1. Os valores experimentais mostram-se condizentes com os valores calculados, significando um bom grau de derivação.

Tabela 4.1: Valores calculados e experimentais do carbamato sintetizado obtidos por CHN

	Teóricos (%)	Experimentais (%)
C	65,66	64,67
H	6,18	5,83
N	6,96	7,24

A análise de espectroscopia no Infravermelho é apresentada na Figura 4.5:

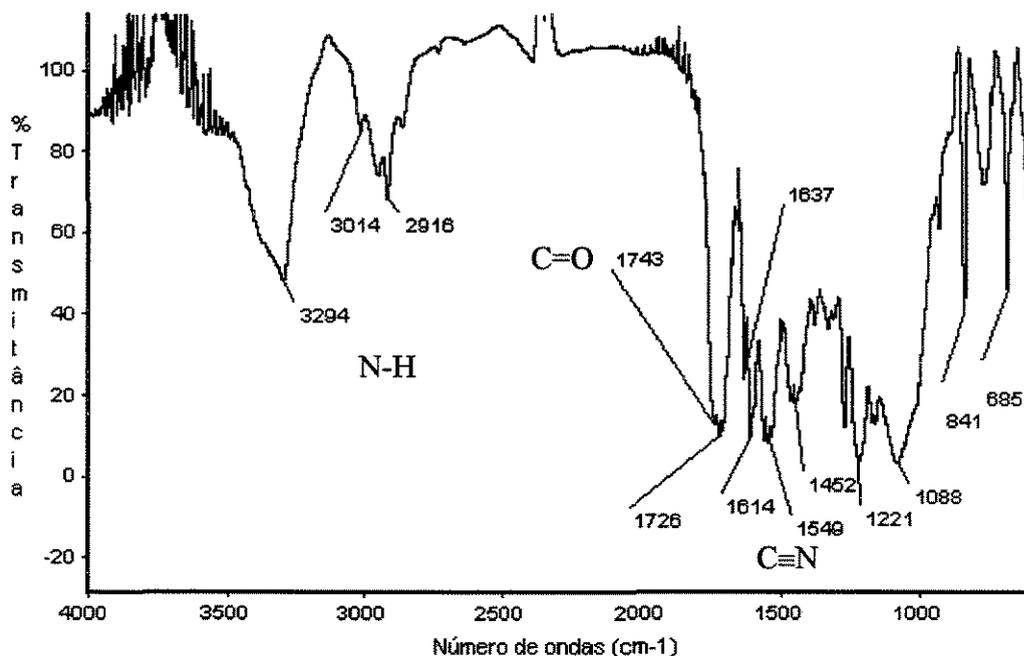


Figura 4.5: Infravermelho do DMFCC sintetizado.

As bandas referentes aos grupamentos CN, CO e NH são indicativas da formação do carbamato (Figura 4.6). A ausência de bandas de absorção correspondente à hidroxila evidencia um bom grau de derivação da celulose. A presença de grupamentos hidroxila é indicativa da ocorrência de reações paralelas (formação de uréia em vez do carbamato) reduzindo assim a eficiência da FEQ. Este resultado está condizente com a análise CHN que não apresentou indicativos de traços de uréia.

A segunda e última etapa da síntese consistiu na adsorção do DMFCC formado sobre sílica Nucleosil e peneiramento do mesmo para uniformização das partículas. A Figura 4.6 mostra uma micrografia da fase estacionária sintetizada. Observa-se a adsorção do carbamato a sílica APS-Nucleosil.

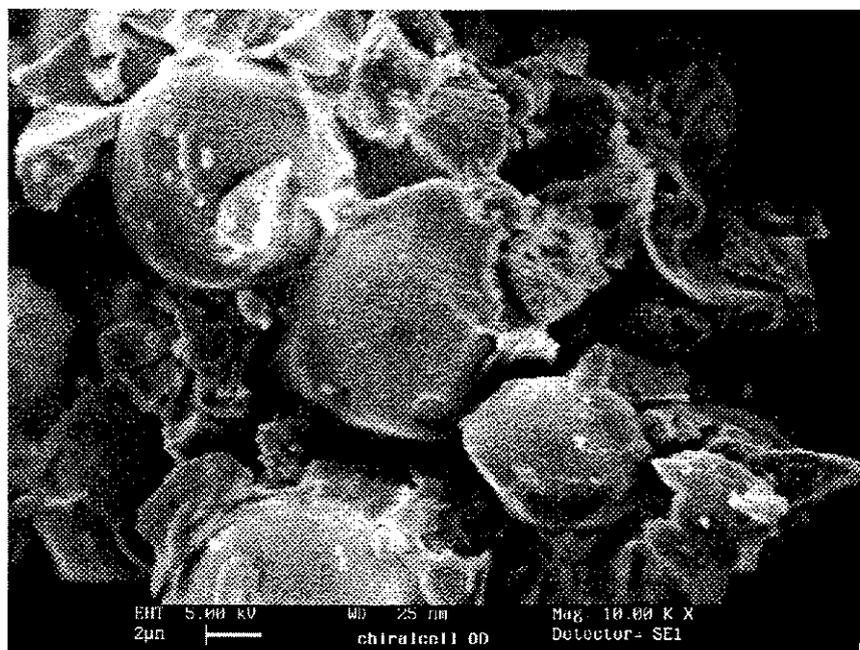


Figura 4.6: Micrografia da tris(3,5 dimetilfenilcarbamato) de celulose suportada em sílica
APS-Nucleosil

A Figura 4.7 mostra a distribuição do tamanho de partícula para esta fase estacionária. A amostra apresenta uma distribuição de tamanho diversificada (variando entre 10 e 39 μm). O tamanho médio das mesmas é de aproximadamente 16 μm . Há ainda a presença de partículas de tamanho médio de 3 μm correspondente a 10 % da amostra.

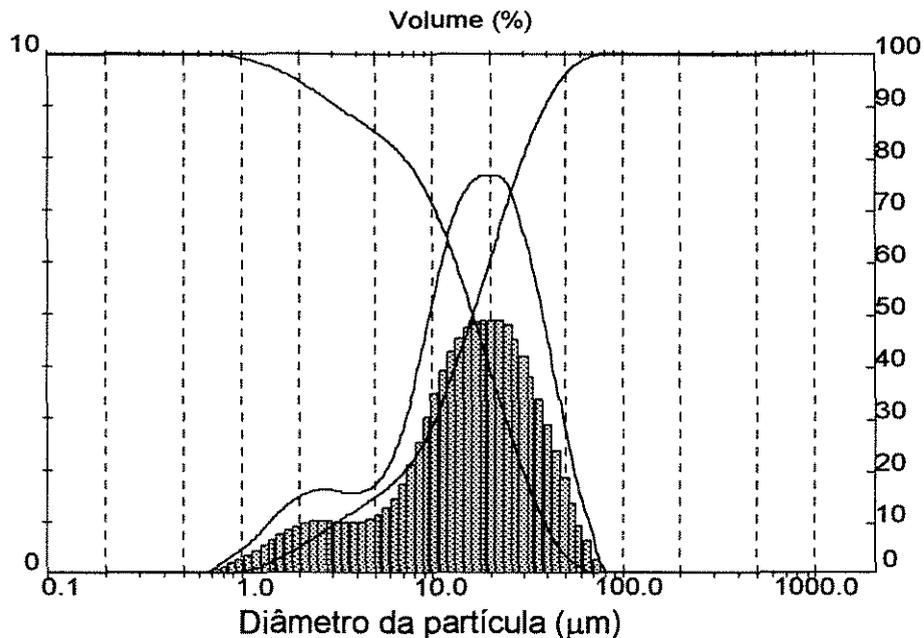


Figura 4.7: Distribuição do tamanho de partícula para a FEQ.

O tamanho de partícula obtido implica em uma maior área superficial e, conseqüentemente, em um maior número de pratos teóricos quando do seu empacotamento nas colunas cromatográficas aumentando a interação entre o adsorbato e o adsorvente e melhorando a separação.

No entanto, a presença de partículas da ordem de 3 μm (finos) eleva a perda de carga no interior das colunas que se traduz em dificuldades operacionais na unidade LMS. Portanto, fez-se necessário a separação destas partículas de acordo com procedimento descrito na secção 3.1.3.

A análise química da fase estacionária foi realizada utilizando-se a técnica de EDX, cujos resultados são apresentados na Figura 4.8. A possível presença do tris(3,5 dimetilfenilcarbamato de celulose) adsorvida à sílica é reforçada pelo pico correspondente ao C.

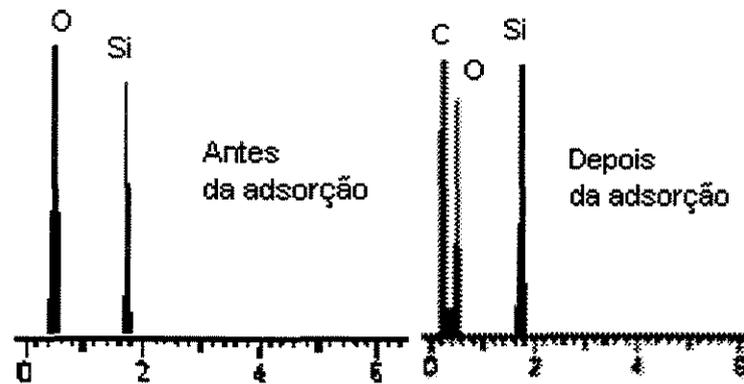


Figura 4.8: Análise EDX do DMFCC

As Figuras 4.9 e 4.10 mostram as análises TGA e dTGA, respectivamente, e a Figura 4.11 a análise DSC, realizadas na FEQ sintetizada. Verifica-se uma perda de água a 100°C, alteração do material polimérico entre 100-300°C e inalteração da sílica usada como suporte na faixa que vai de 500 a 1000°C. A presença de picos endotérmicos na faixa 150-300°C (Figura 4.12) sugere uma decomposição da amostra em estudo. Estes resultados estão de acordo com as propriedades apresentadas pela amostra: celulose que carameliza a temperaturas superiores a 100°C.

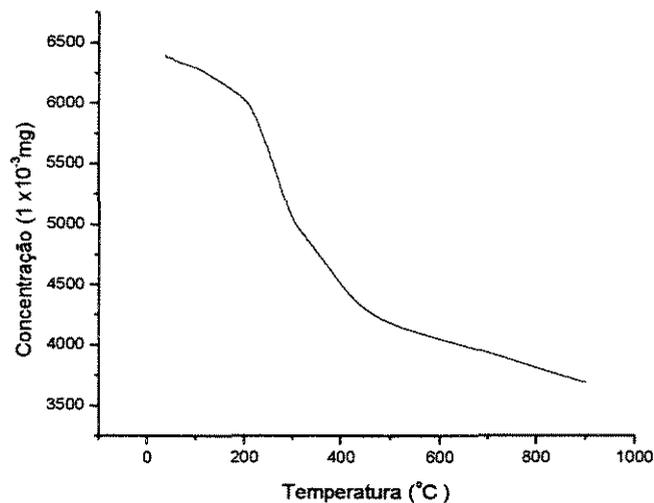


Figura 4.9: Curva TGA para a FEQ.

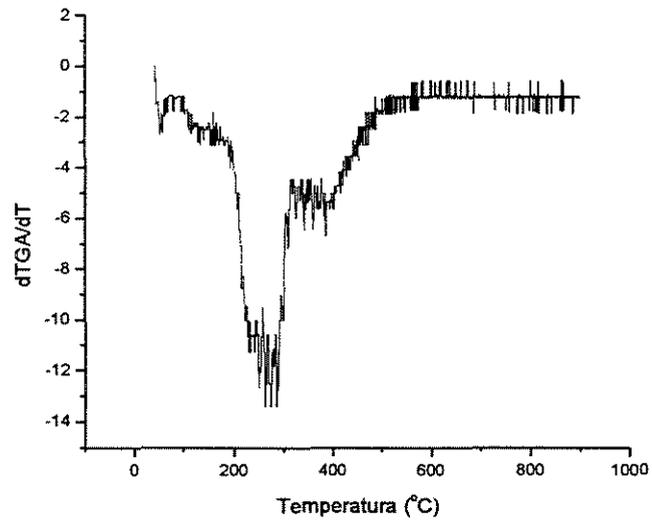


Fig. 4.10: Curva DTGA para a FEQ.

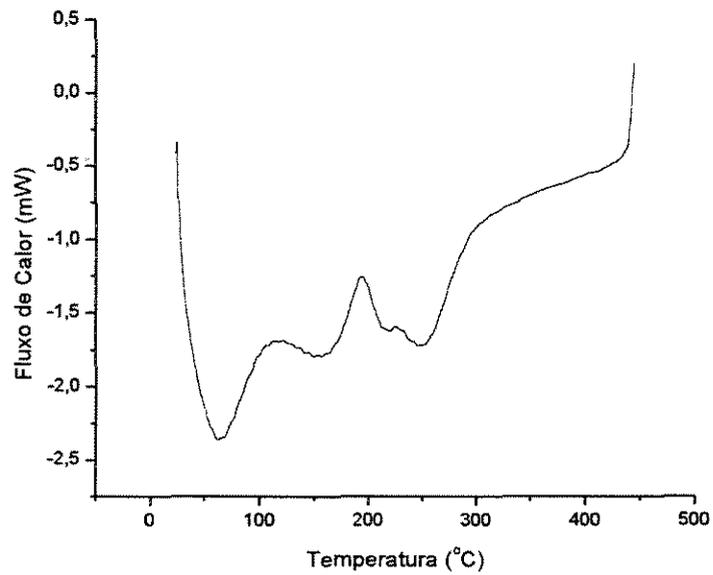


Figura 4.11: Curva DSC para a FEQ.

4.2 Corridas cromatográficas em leito fixo

Duas colunas quirais analíticas de aço inoxidável foram confeccionadas a fim de determinar os parâmetros termodinâmicos e cinéticos.

As colunas empacotadas com a DMFCC apresentaram um bom desempenho quanto à resolução e a seletividade do *N*-Boc-Rolipram (Figura 4.12).

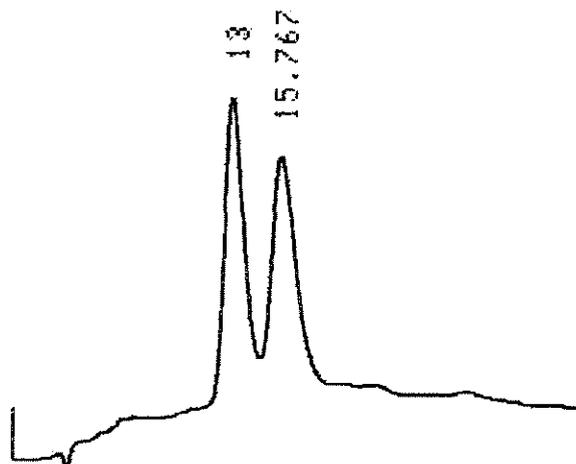


Figura 4.12: Separação do racemato *N*-Boc-Rolipram. Coluna 1 (0,45 x 15 cm). Fase móvel: hexano/isopropanol 90:10 v/v. Temperatura: 25°C. Vazão: 0,7 mL/min. Faixa de medida: 270nm. Volume de injeção: 25 μ L

Objetivando-se comparar o desempenho da FEQ tris(3,5-dimetilfenilcarbamato) de celulose suportada em sílica com outras FEQ, algumas corridas cromatográficas foram realizadas utilizando-se MCTA como fase estacionária quiral e etanol puro (fase móvel) para separar os enantiômeros do racemato Rolipram. Os resultados obtidos são mostrados na Figura 4.13:

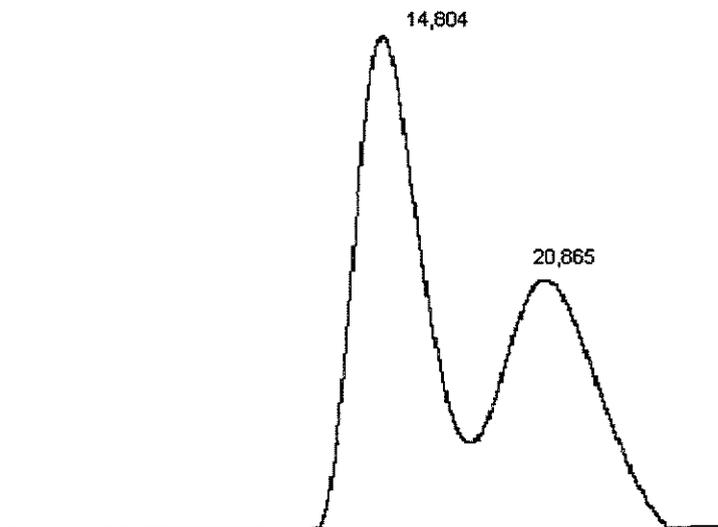


Figura 4.13: Separação do racemato Rolipram em *MCTA*. Coluna 1 (0,45 x 15 cm). Fase móvel: Etanol 100%. T - 25°C. Vazão - 0.7 mL/min. Faixa de medida: 254 nm. Volume de injeção: 25 μ L

Embora ambas as fases estacionárias apresentem bom desempenho na separação do racêmico, pela análise dos cromatogramas quanto à resolução dos picos (alargamento das bandas cromatográficas), é possível constatar a superioridade da FEQ tris (3,5-dimetilfenilcarbamato) de celulose suportada em sílica sobre o *MCTA*.

A obtenção de algumas propriedades (porosidade do leito, coeficiente de dispersão axial e vazões ótimas de separação) foi realizada para ambas as colunas quirais analíticas.

Na determinação da porosidade global e dispersão axial do leito utilizou-se o inerte 1,3,5-TTBB na concentração de 1 mg/mL. O cálculo foi realizado seguindo procedimento descrito no capítulo 3.2.3. As Figuras 4.14 e 4.15 mostram os resultados obtidos.

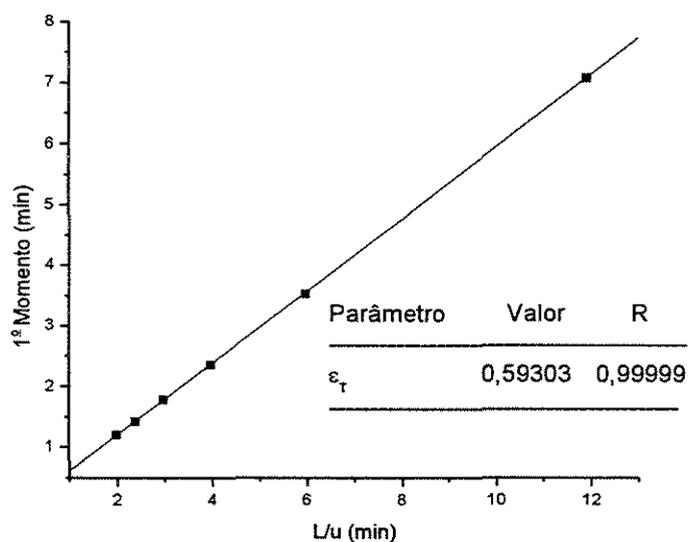


Figura 4.14: Porosidade global da coluna quiral analítica 1 (empacotada com a FEQ sintetizada) – Coluna 1 (0,45 x 15 cm). Fase móvel: hexano/isopropanol 90:10 v/v. T- 25°C.

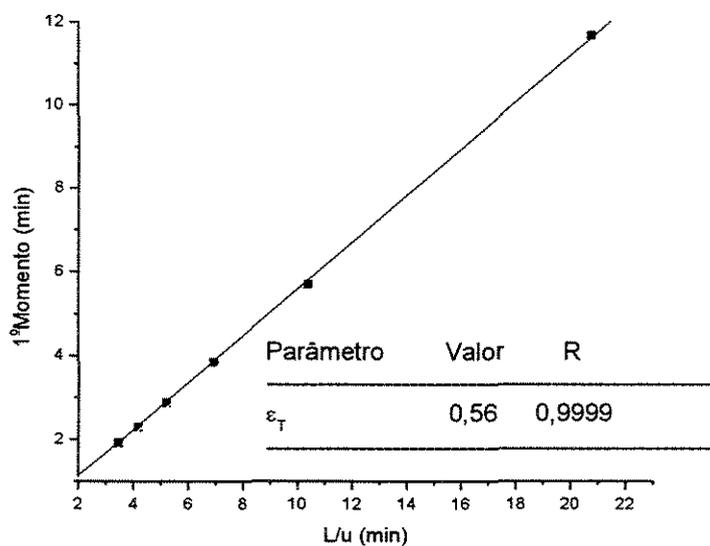


Figura 4.15: Porosidade global da coluna quiral analítica 2 (empacotada com a FEQ sintetizada) – Coluna 2 (0,45 x 25 cm). Fase móvel: hexano/isopropanol 90:10 v/v. T- 25°C.

A porosidade do leito foi calculada utilizando-se a correlação descrita no item 3.3.3.2 do capítulo 3 e o valor encontrado foi igual a 0,25 para a coluna 1 e 0,20 para a coluna 2. Os resultados apresentados evidenciam um leito bem empacotado, implicando em colunas com maior poder de separação (maior número de pratos teóricos).

A dispersão axial foi calculada utilizando-se a equação descrita no item 3.3.3.3 do capítulo 3.3 a partir dos valores encontrados pelas curvas HETP x velocidade intersticial mostradas nas Figuras 4.16 e 4.17 para as colunas 1 e 2 respectivamente. Os valores encontrados foram iguais a $0,01v$ na coluna 1 e $0,02v$ na coluna 2. Estes valores implicam em um baixo coeficiente de Dispersão Axial o que favorece a separação do adsorbato no interior da coluna. DUAN *et al.* (1998), trabalhando com uma coluna fornecida pela Daicel, cujas dimensões eram as mesmas da coluna quiral analítica 2, encontrou os mesmos resultados de dispersão axial, evidenciando, assim, um bom empacotamento da mesma. Ambos os resultados apresentados, porosidade e dispersão axial, evidenciam o bom desempenho do método de empacotamento empregado.

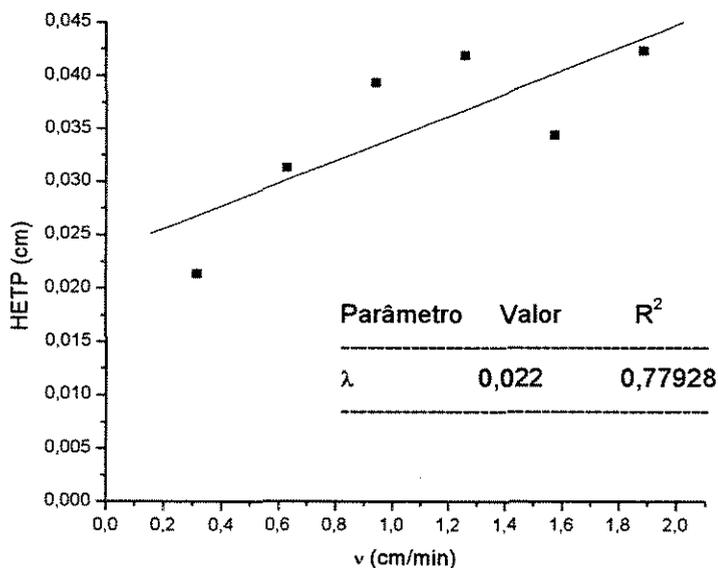


Figura 4.16: Valores de dispersão axial da coluna quiral analítica 1 (empacotada com a Feq sintetizada). Coluna 1 (0,45 x 15 cm). Fase móvel: hexano/isopropanol 90:10 v/v. T- 25°C.

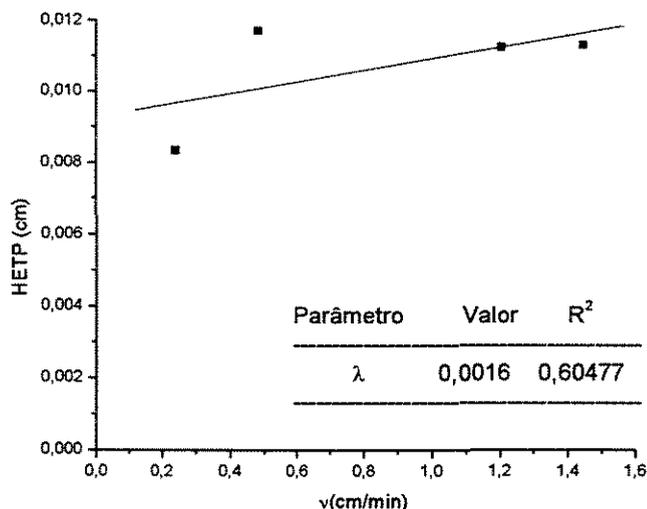


Figura 4.17: Valores de dispersão axial da coluna quiral analítica 2 (empacotada com a FEQ sintetizada). Coluna 2 (0,45 x 25 cm). Fase móvel: hexano/isopropanol 90:10 v/v. T- 25°C.

Utilizando-se a coluna quiral analítica 1 (0,45 x 15 cm) foram realizados experimentos para a determinação da influência da temperatura sobre o coeficiente de separação (α) e determinação das isothermas competitivas dos racêmicos estudados.

Como mostrado na Figura 4.18 o processo de adsorção dos enantiômeros é exotérmico, ou seja, um aumento na temperatura não favorece a separação dos racematos. No entanto, para sistemas em fase líquida, um aumento na temperatura normalmente favorece o processo de separação dos enantiômeros na FEQ tris(3,5 DMFCC) suportada em sílica (KÜSTERS & SPÖNDLIN,1996). Uma hipótese para explicar este fenômeno seria a adição do isopropanol (agente modificador da polaridade) na concentração de 10% que diminuiria o tempo de adsorção dos enantiômeros na FEQ sintetizada.

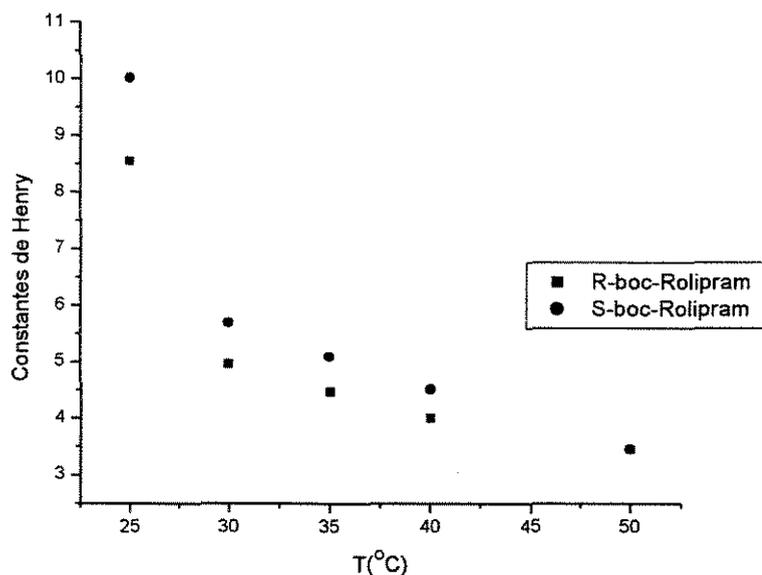


Figura 4.18: Influência da temperatura sobre as constantes de Henry do *N*-Boc-Rolipram. Coluna 1 : 0,45 cm x 15 cm. Fase móvel: hexano / isopropanol 90/10 v/v.

A Figura 4.19 mostra o gráfico de $\ln \alpha \times 1/T$ dos enantiômeros do *N*-Boc-Rolipram. Verifica-se um comportamento linear do *N*-Boc-Rolipram indicando que não há mudança do mecanismo de retenção dos enantiômeros com a FEQ sintetizada como uma função da temperatura. O valor negativo de $\Delta_{(S,R)} \Delta H^\circ$, superior a 1Kcal/mol, indica que o processo de separação dos enantiômeros é entalpicamente controlado. Este fato também foi verificado por outros autores (KÜSTERS & SPÖNDLIN, 1996; HE *et al.*, 2004).

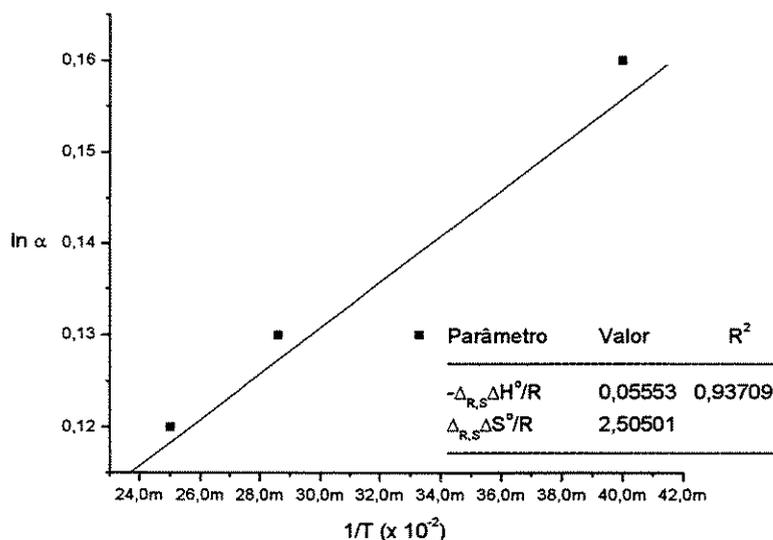


Figura 4.19: Obtenção dos parâmetros de Gibbs-Helmholtz do *N*-Boc-Rolipram. Coluna 1: 0,45 cm x 15 cm. Fase móvel: hexano / isopropanol 90/10 v/v.

Como mostrado nas Figuras 4.20 e 4.21 ambos os adsorbatos comportam-se de maneira semelhante, tanto no processo de adsorção quanto no de dessorção na FEQ sintetizada. A isoterma de adsorção apresenta um comportamento semelhante à isoterma BET tipo II, ou seja, em uma faixa de concentrações (0- 2,5 mg/mL) a isoterma evidencia uma adsorção monocamada e acima desta faixa de concentrações denota-se uma adsorção multicamada. É preciso salientar que as FEQs suportadas em sílica apresentam dois sítios adsortivos: um sítio seletivo, capaz de realizar o reconhecimento quiral, e um sítio não-seletivo (sílica de suporte), no qual ambos os enantiômeros adsorvem igualmente. Assim, um estudo mais detalhado na região de 0-2,5 mg/mL faz-se necessário para compreender o processo de adsorção e dessorção na FEQ sintetizada.

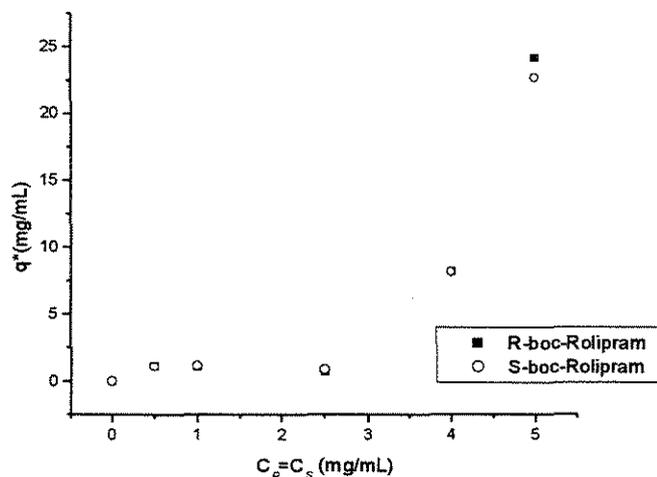


Figura 4.20: Isoterma de adsorção competitiva do *N*-Boc-Rolipram.

Coluna 1: 0,45 cm x 15 cm. Fase móvel: hexano / Isopropanol 90/10 v/v. T - 25°C. $C_R = C_S$.

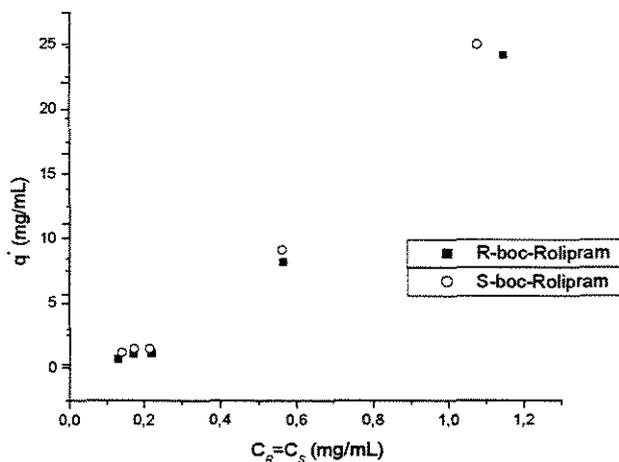


Figura 4.21: Isoterma de dessorção competitiva do *N*-Boc-Rolipram.

Coluna 1: 0,45 cm x 15 cm. Fase móvel: hexano / isopropanol 90/10 v/v. T 25°C. $C_R = C_S$.

Observando-se as curvas de adsorção-dessorção realizadas para a mistura racêmica a 1 e 10 mg/mL é possível verificar uma maior afinidade do enantiômero *S* pela FEQ, uma vez que mesmo dessorve um pouco mais lentamente que o enantiômero *R* (Figuras. 4.22 e 4.23). Este

fato sugere que a cinética de adsorção pode ter importância fundamental no processo de separação dos enantiômeros.

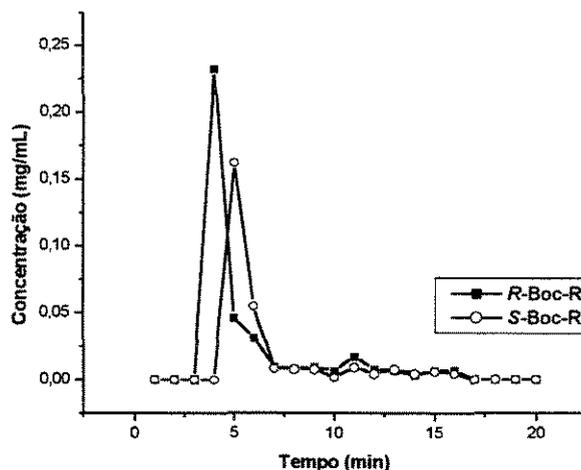


Figura 4.22: Curva de adsorção-dessorção Competitiva do *N*-Boc-Rolipram.
Coluna 1: 0,45 x 15 cm . Fase móvel: hexano / Isopropanol 90/10 v/v. T - 25°C.
Concentração: 1mg/mL

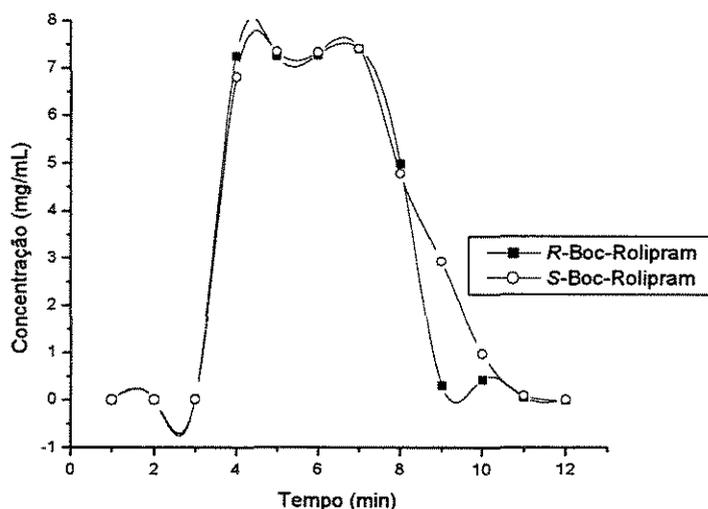


Figura 4.23: Curva de adsorção-dessorção competitiva do *N*-Boc-Rolipram.
Coluna 1: 0,45 x 15 cm. Fase móvel: hexano / Isopropanol 90/10 v/v. T - 25°C.
Concentração: 10 mg/mL

A coluna quiral analítica 2, empacotada com a FEQ sintetizada, foi utilizada nos experimentos realizados com os enantiômeros puros para a obtenção dos parâmetros de equilíbrio (constantes de adsorção) e cinéticos (*HETP*, número de pratos teóricos e coeficiente de transferência de massa).

As Figuras 4.24 e 4.25 mostram os gráficos obtidos a partir do 1º momento $\times L/u$ e do *HETP* $\times u$, respectivamente, para o *R*-Boc-Rolipram a 25°C.

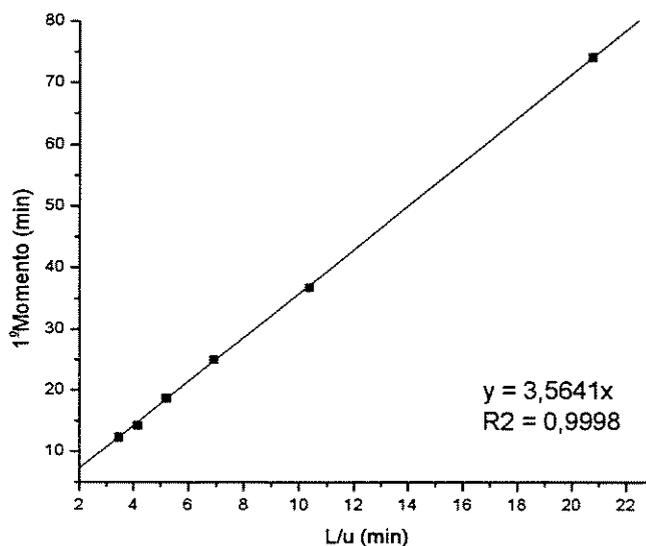


Figura 4.24: Curva do 1º momento $\times L/u$ do *R*-Boc-Rolipram. Coluna 2: 0,45 \times 25 cm. Fase móvel: hexano / Isopropanol 90/10 v/v. T- 25°C. Concentração: 0,2 mg/mL.

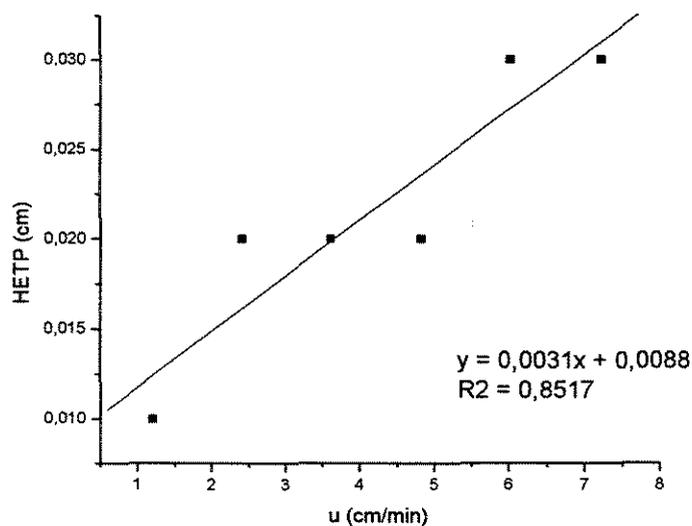


Figura 4.25: Curva do *HETP* x *u* do *R*-Boc-Rolipram. Coluna 2: 0,45 x 25 cm. Fase móvel: hexano / Isopropanol 90/10 v/v. T- 25°C. Concentração: 0,2 mg/mL.

As Figuras 4.26 e 4.27 mostram os gráficos obtidos a partir do 1º momento x *L/u* e do *HETP* x *u* respectivamente para o *S*-Boc-Rolipram a 25°C.

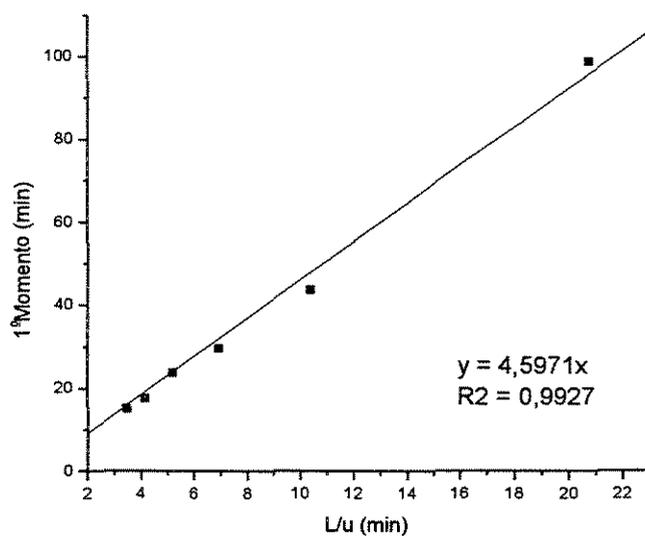


Figura 4.26: Curva do 1º momento x *L/u* do *S*-Boc-Rolipram. Coluna 2: 0,45 x 25 cm. fase móvel: hexano /isopropanol 90/10 v/v. T- 25°C. Concentração: 0,2 mg/mL.

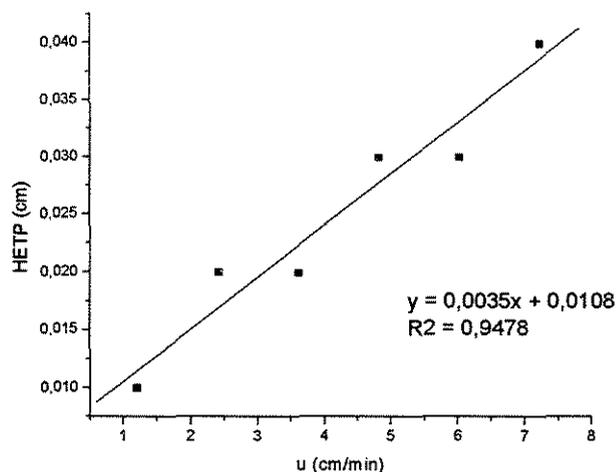


Figura 4.27: Curva do *HETP* x *u* do *S*-Boc-Rolipram. Coluna 2: 0,45 x 25 cm. Fase móvel: hexano /isopropanol 90/10 v/v. T- 25°C. Concentração: 0,2 mg/mL

As constantes de equilíbrio para o *R* e o *S* – Boc Rolipram foram encontradas de acordo com a relação expressa na Equação 2.16, a partir do coeficiente angular obtido das Figuras 4.24 e 4.26, respectivamente.

O *HETP* para cada um dos enantiômeros (*R* e *S*) foi encontrado a partir da relação entre o quadrado do primeiro momento e o segundo momento. A partir do coeficiente angular obtido pelo gráfico do *HETP* x *u* (Figs 4.25 e 4.27), é possível calcular, de acordo com a Equação 2.5, os demais parâmetros cinéticos. Os resultados são mostrados na Tabela 4.5.

Tabela 4.5: Parâmetros cinéticos e de equilíbrio dos enantiômeros do *N*-Boc-Rolipram

	Número De Pratos Teóricos (N_p)	Dispersão Axial D_L (adimensional)	Constante de Equilíbrio H (adimensional)	Coefficiente de Transferência de Massa K_L (s^{-1})	Difusividade D ($cm\ s^{-2}$)
R-boc- Rolipram	1134	0,02 v	4,21	1,14	$5,68 \times 10^{-7}$
S-boc- Rolipram	903	0,02v	5,50	0,79	$5,16 \times 10^{-8}$

Embora o *R*-Boc-Rolipram apresente uma constante de equilíbrio menor que o *S*-Boc-Rolipram, indicando uma menor afinidade com a fase estacionária quiral sintetizada; mostra uma difusividade, calculada a partir do K_L , maior quando comparado ao *S*-Boc-Rolipram. Este fato influencia diretamente no número de pratos teóricos necessários à separação dos enantiômeros presente na mistura racêmica, ou seja, o *R*-Boc-Rolipram se difunde muito mais rapidamente entre os poros da fase estacionária o que faz com que interaja com a FEQ sintetizada um maior número de vezes.

Uma hipótese sugerida, para explicar este fenômeno, é de que o arranjo espacial do *R*-Boc-Rolipram favoreceria a difusão no interior dos poros do adsorvente ao mesmo tempo em que desfavoreceria a sua adsorção na FEQ sintetizada. A mesma hipótese também seria válida para o *S*-Boc-Rolipram, ou seja, seu arranjo espacial desfavoreceria sua difusão no interior dos poros do adsorvente, mas tornaria favorável a sua adsorção na FEQ sintetizada.

Baseado nesta hipótese espera-se que o *R*-boc-Rolipram seja mais bem separado nesta FEQ do que o *S*-Boc-Rolipram.

4.3 Corridas cromatográficas no sistema de Leito Móvel Simulado

A unidade LMS montada na Faculdade de Engenharia Química (FEQ) da UNICAMP consiste de um conjunto de oito colunas de adsorção (0,78 x 20 cm) empacotadas com a FEQ sintetizada. Foram realizados experimentos para caracterizá-las – determinação das porosidades total e do leito – assim como para obtenção das constantes lineares (constantes de Henry). A Tabela 4.3 mostra os valores obtidos.

Tabela 4.3: Constantes de Henry, fator de separação e porosidades global e do leito para as colunas da unidade LMS.

Coluna	ϵ_T	ϵ	H_1	H_2	α
1	0,53	0,42	2,34	2,94	1,26
2	0,52	0,33	2,38	3,01	1,26
3	0,53	0,44	2,48	3,14	1,27
4	0,53	0,46	2,46	3,11	1,27
5	0,54	0,38	2,52	3,19	1,26
6	0,54	0,33	2,52	3,18	1,27
7	0,54	0,33	2,46	3,10	1,26
8	0,53	0,31	2,21	2,72	1,23
Média	0,53	0,37	2,42	3,05	1,26

Colunas: 0,78 x 20 cm. Fase móvel: hexano / Isopropanol 70/30 v/v. Faixa de medida:

270 nm. Vazão: 1 mL/min. T- 25°C

Verifica-se uma boa homogeneidade das colunas empacotadas, tanto nos valores de porosidade, indicando um empacotamento similar para todas as oito colunas; como nas constantes de Henry obtidas, indicando uma fase estacionária quiral homogênea e enantiosseletiva.

Os valores de α obtidos confirmam o bom desempenho do conjunto de colunas e estão na faixa necessária (1,3 – 2,0) para promover uma boa separação através do processo cromatográfico contínuo de Leito Móvel simulado (LMS) segundo SCHULTE & STRUBE, (2001).

A fim de que a unidade possa operar de maneira uniforme e sem problemas mecânicos é essencial que as colunas tenham pequenas perdas de carga e que estas sejam semelhantes. Com este objetivo procurou-se remover as partículas finas (diâmetro menor que 3 μm), de acordo com o procedimento descrito na secção 3.1.3. O resultado é mostrado na Figura 4.28. É possível observar que as colunas apresentaram uniformidade e baixa perda de carga.

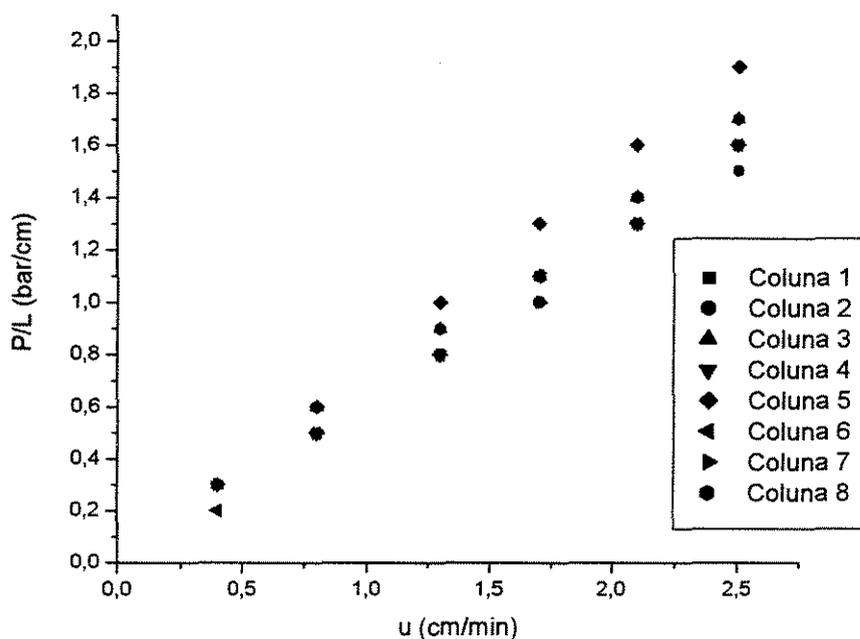


Figura 4.28: Perda de carga das oito colunas de adsorção. Colunas: 0,78 x 20 cm. Fase móvel: hexano / Isopropanol 70/30 v/v. T- 25°C

A partir dos valores das constantes de Henry obtidas construiu-se um triângulo de separação, de acordo com o procedimento descrito na secção 3.4.2, para cada coluna que integraria a unidade LMS. A Figura 4.29 mostra um diagrama dos triângulos de separação obtidos.

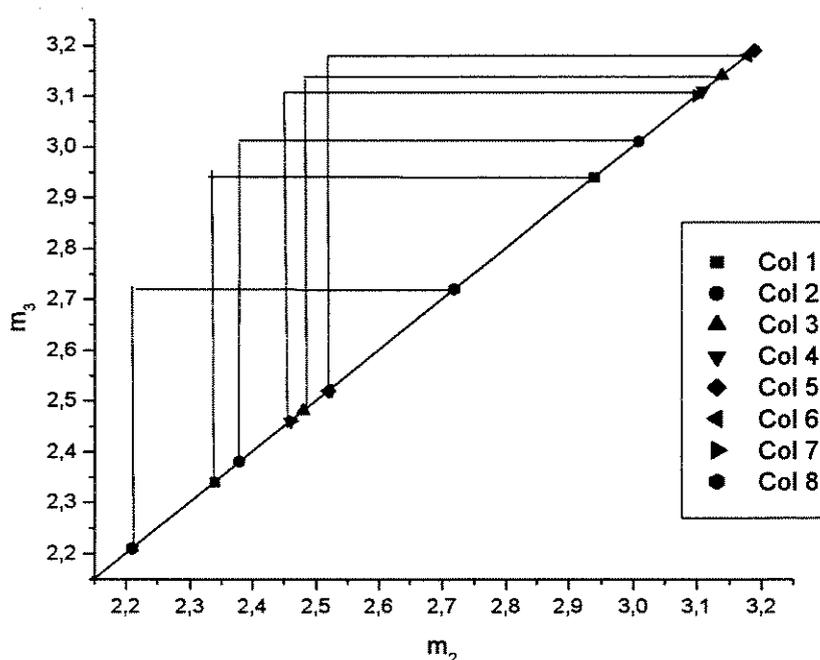


Figura 4.29: Triângulos de separação para cada coluna da unidade LMS.

Colunas: 0,78 x 20 cm. Fase móvel: hexano / Isopropanol 70/30 v/v. Faixa de Medida: 270 nm. T- 25°C.

A área comum a todos os triângulos constituiu-se no triângulo de separação utilizado neste trabalho. A Fig. 4.30 mostra em detalhes o triângulo e os pontos (quadrados) que promoveram uma melhor separação da mistura racêmica do *N*-Boc-Rolipram na FEQ tris(3,5 dimetilfenilcarbamato de celulose) suportada em sílica (3,5 DMFCC). O ponto indicado pela letra "A" constitui-se no ponto ótimo; ou seja, aquele no qual é alcançado o melhor desempenho da unidade LMS para a separação da mistura racêmica.

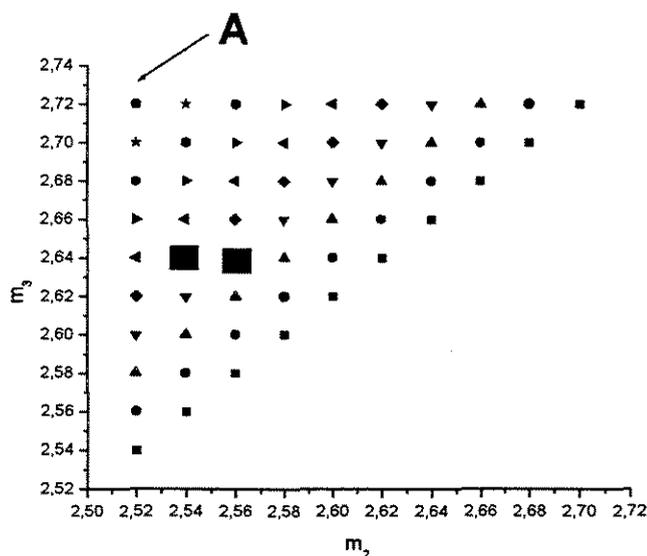


Figura 4.30: Triângulo de separação do *N*-Boc-Rolipram na tris(3,5 DMFCC) suportada em sílica a 25°C.

A Tabela 4.4 apresenta as condições de operação de uma corrida (condição 1) realizada para um tempo de troca (t^*) de 20 minutos e concentração da alimentação $C_A = 2,5$ g/L .

Tabela 4.4 – Condições de operação no LMS sob a Condição 1 $t^* = 20$ min.

Parâmetros de operação				Vazões em cada secção (mL/min)				Vazões de operação (mL/min)				
\overline{m}_1	\overline{m}_2	\overline{m}_3	\overline{m}_4	Q_1	Q_2	Q_3	Q_4	D_{ent}	D_{sai}	F	Ex	Re
3,25	2,56	2,64	1,40	1,06	0,82	0,92	0,64	1,06	0,64	0,10	0,24	0,28

O tempo de duração desta corrida correspondeu a seis ciclos, período no qual o sistema chegou ao estado estacionário. Este fato foi constatado pelo sinal do sistema de aquisição de dados do sistema LMS, formados pelo UV/visível e pelo polarímetro, como mostram as Figuras 4.31 e 4.32, respectivamente.

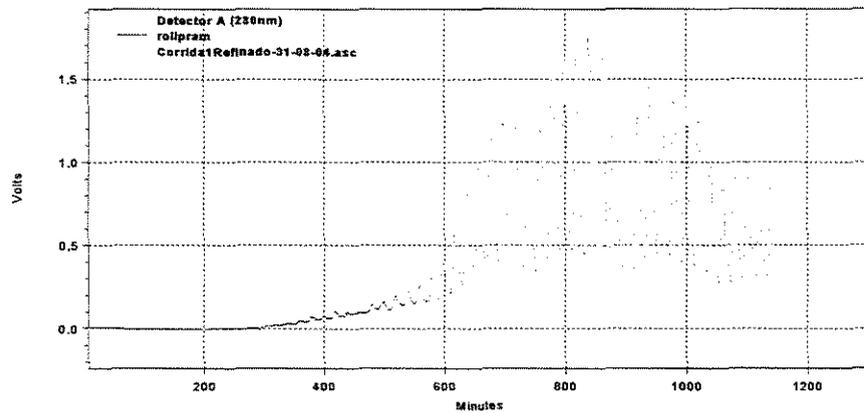


Figura 4.31: Sinal do UV/Visível para o experimento na condição 1.

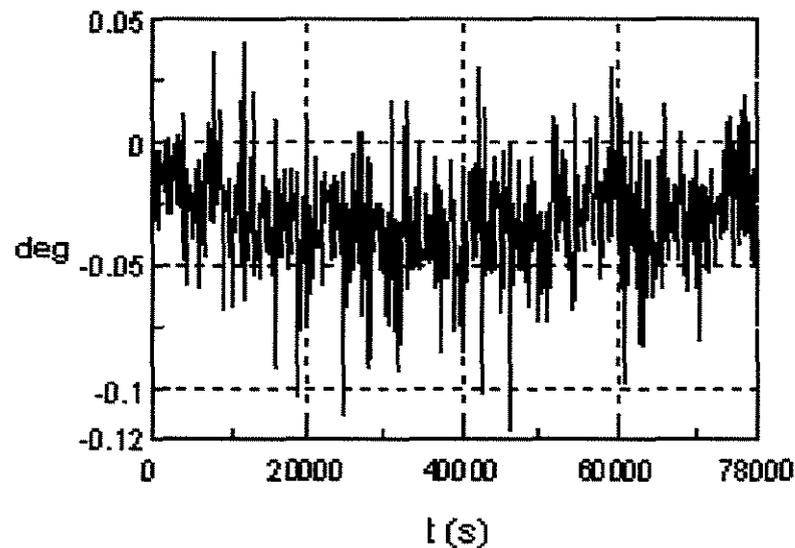


Figura 4.32: Sinal do polarímetro para o experimento na condição 1.

O bom controle das vazões, crucial para se operar o leito com sucesso e promover uma boa separação, foi evidenciado pela baixa contaminação da corrente de desorvente de saída (D_{sai}) mostrado na Figura 4.33 cuja concentração é correspondente as impurezas presentes na amostra (absorbância da ordem de 0,0002).

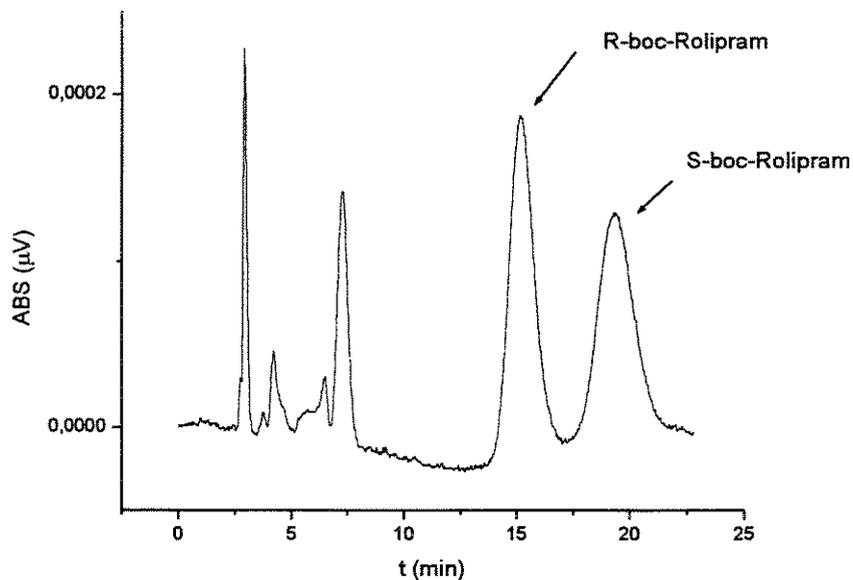


Figura 4.33: Cromatograma da corrente de dessorvente de saída na condição 1

A Tabela 4.5 mostra os valores de pureza e excesso enantiomérico para as correntes de extrato e refinado em cada ciclo, até o estado estacionário (ciclo 6). Com os valores encontrados para a corrente de refinado, é possível tentar uma próxima etapa de separação: a cristalização. No entanto, a corrente de extrato precisaria de uma nova etapa de purificação no próprio sistema LMS.

Tabela 4.5: Análise da pureza e do excesso enantiomérico das correntes de extrato e refinado

Ciclos	Análise do Refinado		Análise do Extrato	
	Pureza (%)	Excesso enantiomérico e.e (%)	Pureza (%)	Excesso enantiomérico e.e (%)
1	51,26	2,52	-	-
2	-	-	58,72	17,44
3	-	-	76,87	53,74
4	70,45	40,90	77,30	54,60
5	89,91	79,82	76,77	53,54
6	91,43	82,86	75,75	51,50

Embora os resultados apresentados nos experimentos realizados com os enantiômeros na coluna quiral analítica 2 sugerissem um melhor desempenho da FEQ sintetizada quanto a separação do *R*-Boc-Rolipram; esperava-se que ambas as correntes de saída apresentassem um bom grau de e.e (valores acima de 80%) baseando-se na teoria do triângulo. Uma hipótese sugerida seria a forte influência dos parâmetros de transferência de massa no processo de adsorção do *S*-Boc-Rolipram, o que afetaria a eficiência das colunas de adsorção. Uma análise mais detalhada da dinâmica de separação na unidade LMS foi acompanhada através da realização do seu perfil interno coletado no ciclo 6 e mostrado nas Figuras 4.34 – 4.36.

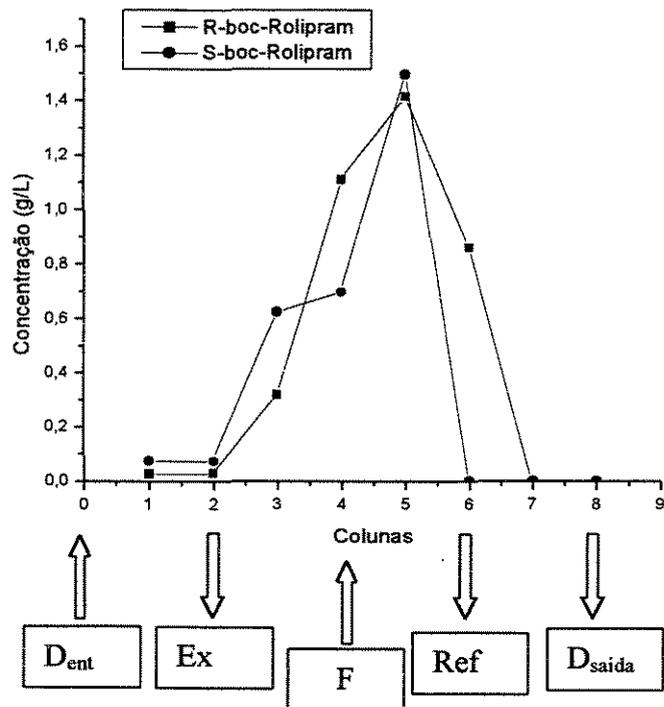


Figura 4.34: Perfil interno a 25% do período.

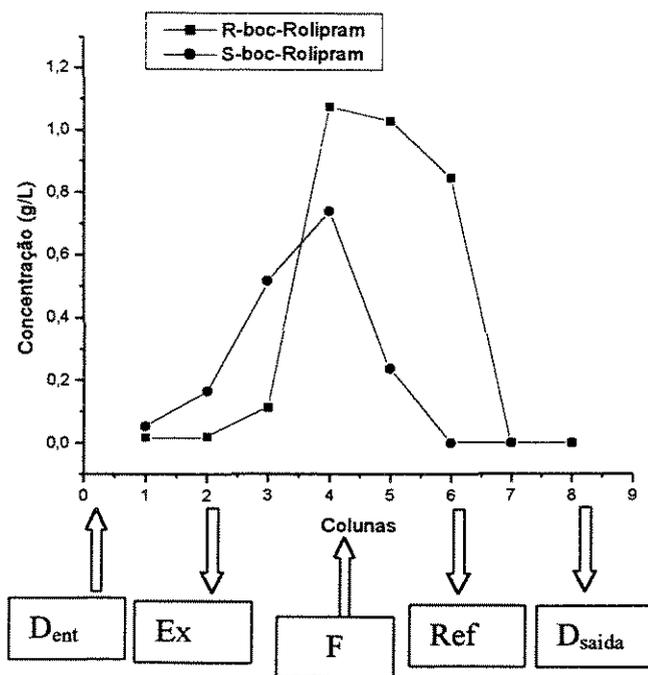


Figura 4.35: Perfil interno a 50% do Período.

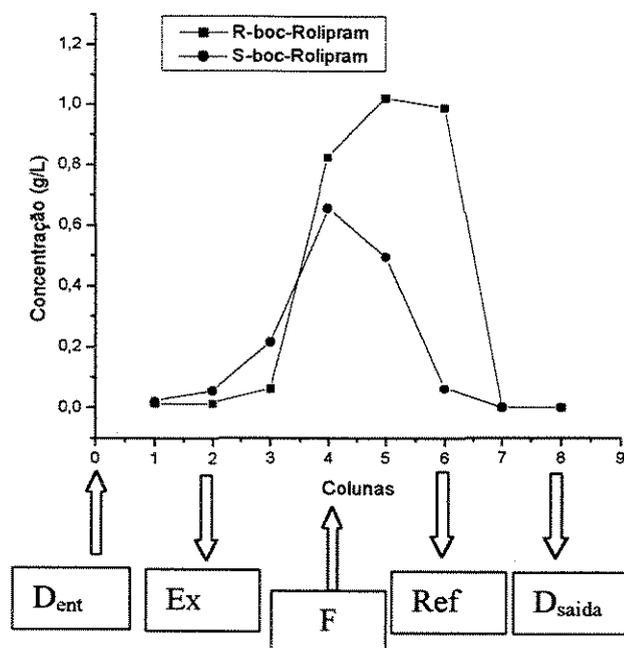


Figura 4.36: Perfil interno a 75% do período.

Analisando-se o perfil interno a 25% (Figura 4.34), verifica-se que a corrente de extrato está sensivelmente contaminada enquanto a corrente de refinado encontra-se completamente pura. À medida que a separação evolui há uma melhora do grau de pureza na corrente de extrato enquanto a corrente de refinado permanece pura (Figura 4.35). A 75 % do período (Figura 4.37) percebe-se uma leve contaminação da corrente de refinado pelo enantiômero *S* e uma contaminação razoável da corrente de extrato pelo enantiômero *R*. Percebe-se que a FEQ sintetizada é muito mais eficiente na separação do enantiômero *R*-Boc-Rolipram do que o enantiômero *S*-Boc-Rolipram.

Alguns parâmetros de desempenho para a unidade foram calculados de acordo com procedimento descrito na secção 3.4.5. Foram encontrados os seguintes valores: 7,2 L de dessorventes consumidos/ g de racêmico, 0,25 g de racêmico alimentado / dia e uma produtividade por volume de FEQ de 7,48 g de racêmico/dia L de FEQ. Estes valores mostram um sistema robusto, formado por uma FEQ de elevada capacidade, quando comparado com o

desempenho do *MCTA*: a uma taxa de alimentação de racêmico de 0,25g/dia gera uma produtividade de 3,27 g de racêmico/dia L de FEQ (dados extrapolados de SANTOS, 2004).

A Tabela 4.6 apresenta as condições de operação da corrida sob a condição 2 realizada para um tempo de troca (t^*) de 20 minutos e concentração da alimentação $C_A = 2,5$ g/L .

Tabela 4.6: Condições de operação no LMS sob a condição 2 $t^* = 20$ min.

Parâmetros de operação				Vazões em cada secção (mL/min)				Vazões de operação (mL/min)				
\bar{m}_1	\bar{m}_2	\bar{m}_3	\bar{m}_4	Q_1	Q_2	Q_3	Q_4	D_{ent}	D_{sai}	F	Ex	Re
3,25	2,56	2,64	1,30	1,06	0,84	0,94	0,62	1,06	0,64	0,10	0,24	0,30

Esta corrida correspondeu a sete ciclos, período no qual o sistema chegou ao estado estacionário. As Figuras 4.37 e 4.38, respectivamente, mostram os sinais correspondentes ao UV/Visível e ao polarímetro.

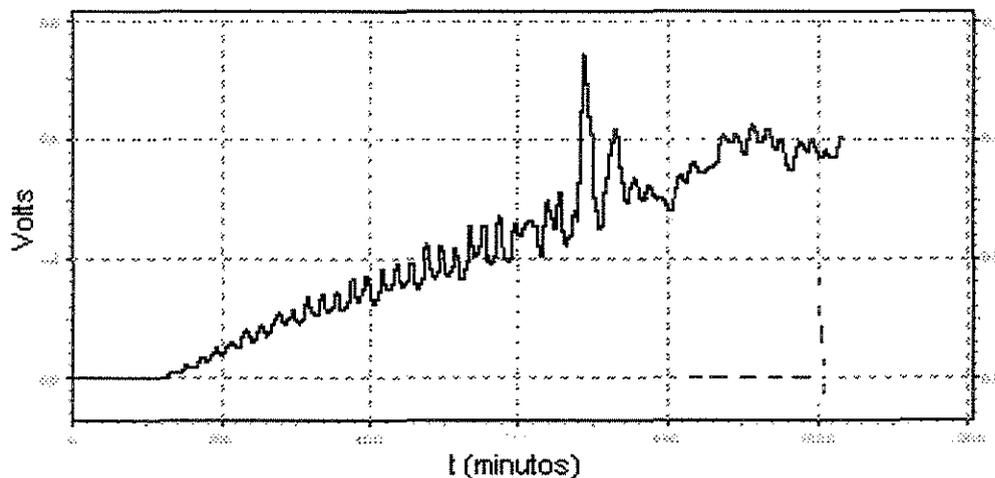


Figura 4.37: Sinal do UV/Visível para o experimento na condição 2.

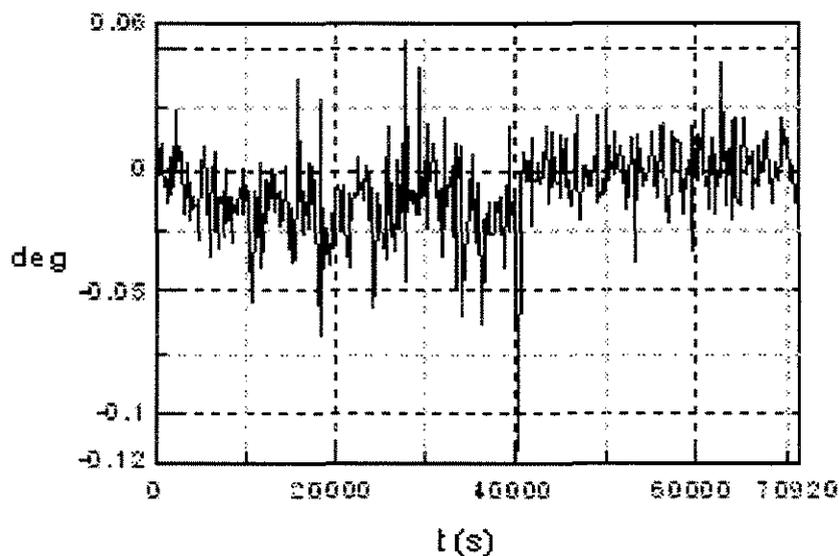


Figura 4.38: Sinal do polarímetro para o experimento na condição 2.

A baixa contaminação da corrente de desorvente de saída (D_{sai}) mostrado na Figura 4.39 demonstra que a unidade foi operada com sucesso (absorbância da ordem de 0,0002).

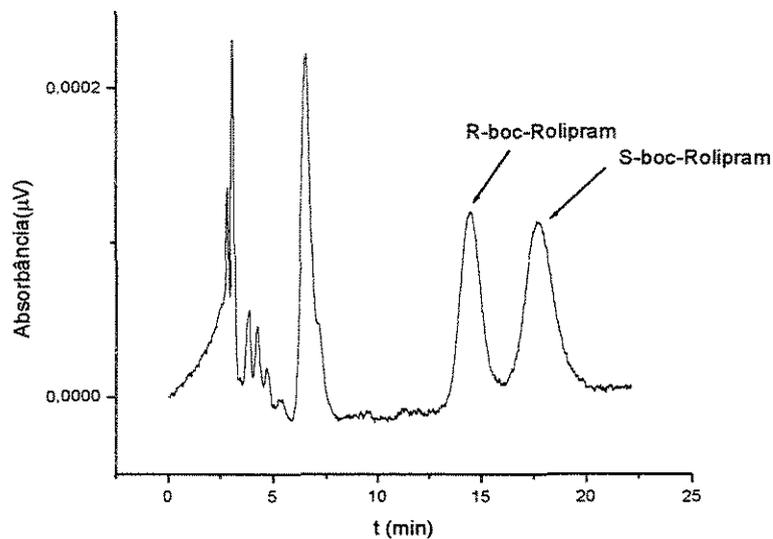


Figura 4.39: Cromatograma da corrente de desorvente de saída na condição 2.

A Tabela 4.7 mostra os valores de pureza e excesso enantiomérico para as correntes de extrato e refinado em cada ciclo até o estado estacionário (ciclo 7). Embora haja uma pequena melhora no enriquecimento da corrente de extrato, uma nova etapa de purificação seria necessária. A corrente de refinado mostrou-se sensivelmente contaminada.

Tabela 4.7: Análise da pureza e do excesso enantiomérico das correntes de extrato e refinado.

Ciclos	Análise do Refinado		Análise do Extrato	
	Pureza (%)	Excesso enantiomérico e.e (%)	Pureza (%)	Excesso enantiomérico e.e (%)
1	56,51	13,02	51	2
2	-	-	-	-
3	57,39	14,78	52,34	-
4	59,60	19,20	62,81	25,62
5	62,04	24,08	63,97	27,94
6	63,61	27,22	70,42	40,84
7	70,24	40,48	79,38	58,76

Este fato não era esperado, uma vez que o ponto escolhido caminha na direção de enriquecimento da corrente de refinado (MAZZOTTI *et al.*, 1997). Uma explicação para este fato seria a elevada concentração da alimentação (2,5 g/L), o que levaria a uma corrida realizada sob condições não-lineares. Nesta situação, o ponto escolhido caminharia na direção de enriquecimento da corrente de extrato (MAZZOTTI *et al.*, 1997). Este fato pode ser mais bem visualizado através da análise do perfil interno (Figuras 4.40 – 4.42).

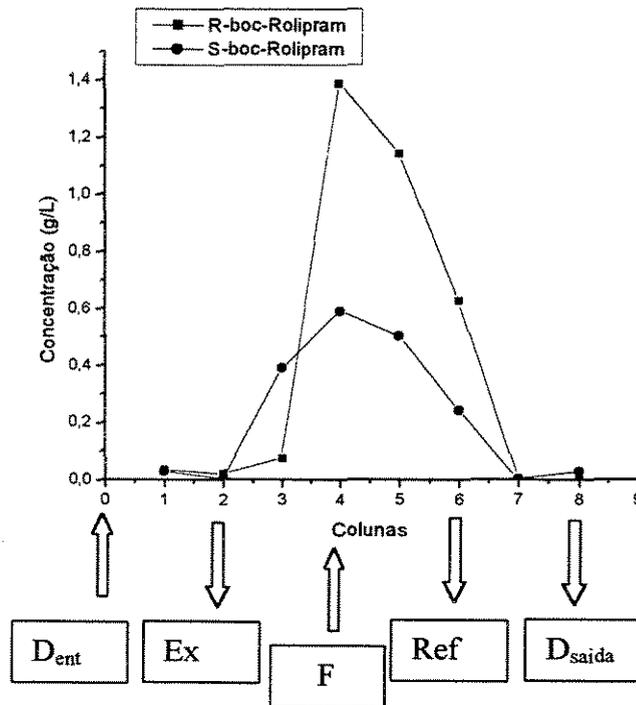


Figura 4.40: Perfil interno a 25% do período.

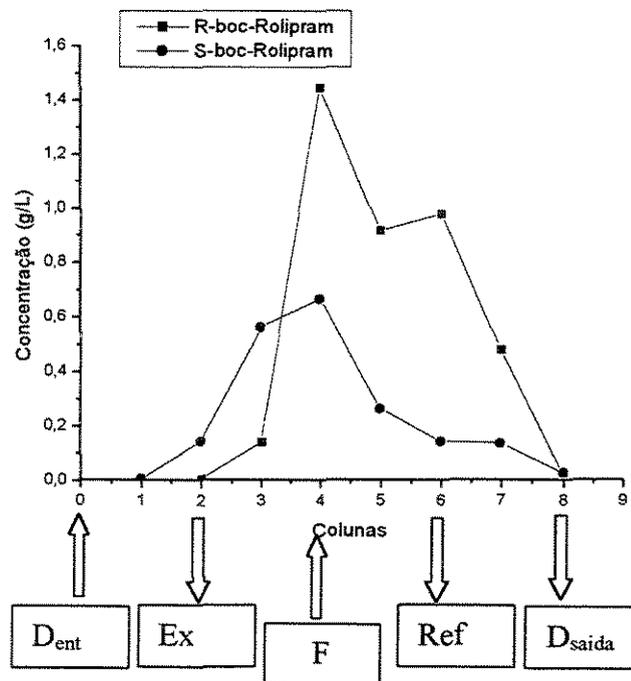


Figura 4.41: Perfil interno a 50% do período

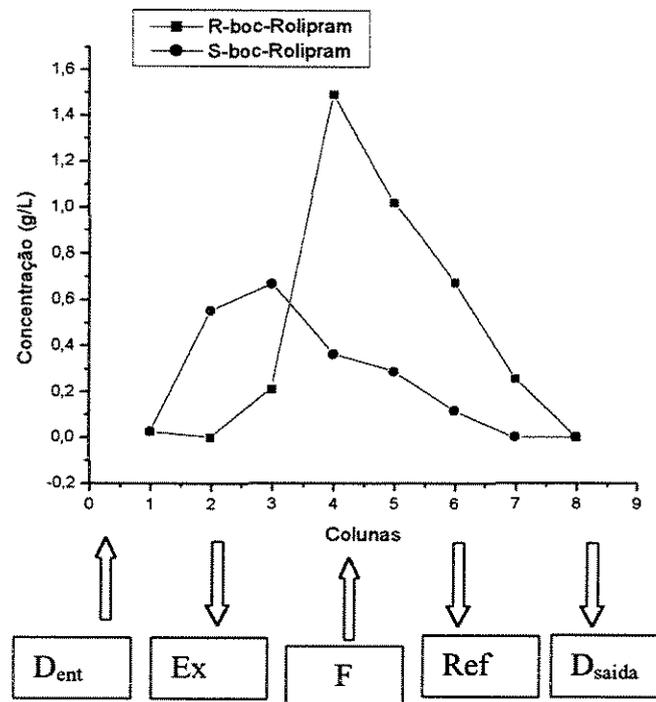


Figura 4.42: Perfil interno a 75% do período.

Analisando-se o perfil interno a 25 % do período, verifica-se que ambas as correntes (extrato e refinado) encontram-se contaminadas. A 50% do período há uma melhora sensível da pureza da corrente de refinado enquanto a corrente de extrato permanece bastante contaminada. A 75% do período a corrente de refinado apresenta uma forte contaminação pelo enantiômero *S* enquanto a corrente de extrato mostra-se razoavelmente pura.

Embora a corrida sob a condição 1 também tenha se realizado a uma concentração da alimentação de 2,5 g/L, segundo MAZZOTTI *et al.* (1997) o ponto escolhido (próximo à linha na qual $m_2 = m_3$) está em uma região de diluição infinita, ou seja uma região na qual a dinâmica da separação ocorrerá sempre sob condições lineares. Desta forma, a corrida realizada sob a condição 1 correspondeu a uma situação na qual a concentração da corrente de alimentação seria baixa.

Parâmetros de desempenho para a unidade sob a condição 2 foram calculados de acordo com procedimento descrito na seção 3.4.5. Foram consumidos 2,6 L de dessorvente / g de racêmico a uma taxa de alimentação de 0,25 g de racêmico / dia e produtividade de 7,48 g de racêmico / dia. L de FEQ. Destaca-se nestes valores o baixo consumo de dessorvente resultante da localização do ponto escolhido, ou seja, quanto mais próximo do vértice A do triângulo (Figura 4.30), menor o consumo de dessorvente (MAZZOTTI *et al.*, 1997).

Uma vez que os valores de produtividade e taxa de alimentação não foram alterados e o consumo de dessorvente apresentou uma elevada diminuição, a corrida realizada sob a condição 2 seria satisfatória desde que apresentasse valores de e.e superiores a 80% para ambas as correntes de saída (extrato e refinado). Faz-se necessário, portanto, determinar o triângulo de separação do *N*-Boc-Rolipram sob condições não-lineares objetivando-se um melhor desempenho da unidade LMS sem prejuízo da purificação das correntes de saída (extrato e refinado).

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

CONCLUSÕES

Os enantiômeros do *N*-Boc-Rolipram foram parcialmente separados na FEQ tris(3,5 dimetilfenilcarbamato de celulose) suportada em sílica através do sistema LMS. O valor de excesso enantiomérico apresentado pelo *R*-Boc-Rolipram na corrida sob a condição 1, que atingiu o valor de 82,86 *e.e.*, foi satisfatório e é possível realizar uma cristalização a fim de se obter um enantiômero com valor de excesso enantiomérico da ordem de 97%. O enantiômero *S*-Boc-Rolipram, retirado na corrente de extrato, necessita ainda de uma nova etapa de purificação na unidade LMS.

O tris(3,5 dimetilfenilcarbamato) de celulose sintetizado na ordem de dezena de gramas apresentou um bom grau de derivação; indicado pelas presença de bandas características do seletor quiral (carbamato de celulose). Seu bom desempenho foi constatado pelo bom grau de resolução dos compostos testados nas colunas analíticas empacotadas com esta FEQ.

Os parâmetros de equilíbrio e cinéticos encontrados para os enantiômeros do *N*-Boc-Rolipram evidenciam uma dinâmica de adsorção que favorece a separação do *R*-Boc-Rolipram. Embora ambos os enantiômeros tenham afinidade diferenciada pela FEQ sintetizada, o processo de difusão dos enantiômeros através dos poros da tris(3,5-dimetilfenilcarbamato de celulose) suportada em sílica é determinante para a dinâmica de transferência de massa.

As isotermas competitivas foram determinadas e os resultados obtidos mostram que ambos os enantiômeros adsorvem de maneira similar na FEQ sintetizada.

As corridas experimentais realizadas na Unidade LMS mostraram o bom desempenho da FEQ sintetizada assim como a eficiência da unidade quanto à separação dos racematos. O controle das vazões, essencial para promover a separação na unidade LMS, foi bem realizado evidenciado pela baixa contaminação da corrente de dessorvente de saída. Este resultado é indicativo da

boa operacionalidade da unidade LMS montado na Faculdade de Engenharia Química da UNICAMP assim como da homogeneidade das colunas empacotadas com a FEQ sintetizada.

Portanto, baseado nos resultados preliminares obtidos há boas perspectivas de produção de colunas cromatográficas quirais preparativas para a implantação no sistema LMS e posterior separação em escala semi-industrial do fármaco estudado.

SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Para um melhor desempenho da unidade LMS é necessário à determinação do triângulo de separação sob condições não-lineares para a mistura racêmica *N*-Boc-Rolipram, assim como os efeitos de resistência à transferência de massa no interior das colunas de adsorção precisam ser considerados.

Simulações computacionais da unidade LMS sob condições não-ideais precisam ser implementadas assim como das colunas de adsorção para uma otimização do processo de separação.

Estudos detalhados precisam ser realizados a fim de se compreender o mecanismo de adsorção e dessorção na FEQ sintetizada. Principalmente na faixa de concentração da alimentação que vai de 1-5 mg/mL de racêmico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABOUL-ENEIN, H.Y. E ABOU-BASHA, *Chirality and Drug Hazards*, New York: Wiley & Sons, 1997. Cap. 1, p. 1.

ANGEL, J. B.; SAGET, B. M.; WALSH, S. P. *Rolipram, a specific type IV phosphodiesterase inhibitor, is a potent inhibitor of HIV-1 replication*. *AIDS*, 9, p.1137-1144, 1995.

BAURES, P. W., EGGLESTON, D. S., EHARDT, K. F., CIELINSKI, L. B., TORPHY, T. J., CHRISTENSEN, S. B. *The Crystal Structure, Absolute Configuration, and Phosphodiesterase inhibitory activity of (+)-1-(4-Bromobenzyl)-4-(3-(cyclopentyloxy)-4-methoxyphenyl)-pyrrolidin-2-one*. *J. of Medic. Chem. Chemistry*, v. 36, No 22, p. 3274-3277, 1993.

BIRESSI, G., QUATTRINI, F., JUZA, M., MAZZOTTI, M., SCHURIG, V., MORBIDELLI, M. *Gas chromatographic simulated moving bed separation of the enantiomers of the inhalation anesthetic enflurane*. *Chem. Eng. Sci.*, 55, p.4537-4547, 2000.

CAHN, R. S. *An Introduction to the Sequence Rule*. *J. Chem. Educ.*, 41, p. 116, 1964.

CASS, Q.B, BASSII, A. L., MATLIN, S.A. *First Direct Resolution of Gossypol Enantiomers on a Chiral HPLC Phase*. *Chirality*, n. 11, v.1, p. 46-49, 1999.

CHARTON, F., NICOUD, R-M. *Complete design of a simulated moving bed*. *J. Chromatogr. A*, 702, p. 97-112, 1995.

CORREIA, C. R. D., GARCÍA, A. L. L. *Relatório Técnico apresentado para deposição de patente no INPI*, 2001.

DÄPPEN, R.; ARM, H.; MEYER, V. *Applications and Limitations of Commercially Available Chiral Stationary Phases For High Performance Liquid Chromatography*. *J.*

Chromatogr. A, 373, p. 1-20, 1986.

DEMnitz, J.; LAVECCHIA, L.; BACHER, E.; KELLER, T. H.; MÜLLER, T.; SCHÜRCH, F.; WEBER, H. P.; POMBO-VILLAR, E. *Enantiodivergent synthesis of (R) - and (S)-Rolipram*. *Molecules*, 3, p. 107-119, 1998.

DINGENEN, J.; KINKEL, J.N. *Preparative chromatographic resolution of racemates on chiral stationary phases on laboratory and production scales by closed-loop recycling chromatography*. *J. Chromatogr. A*, 666, p. 627-656, 1994.

DUAN, G., CHING, C. B., SWARUP, S. N. *Kinetic and Equilibrium Study of the Separation of propranolol Enantiomers by high performance Liquid Chromatography on a Chiral Adsorbent*. *Chem. Eng. Journal*, 69, p. 11-117, 1998.

ELIEL, E. L., WILEN, S. H. *Stereochemistry of Organic Compounds*. New York: John Wiley & Sons, 1994, 1267 p.

FRANCOTTE, E., WOLF, R. F., LOHMANN, D. E., MÜLLER, R. *Chromatographic resolution of racemates on chiral stationary phases: I. Influence of the supramolecular structure of cellulose triacetate*. *J. Chromatogr. A*, 347, p. 25-37, 1985.

FRANCOTTE, E., JUNKER-BUCHHEIT, A. *Preparative chromatographic separation of enantiomers*. *J. of Chromatogr.: Biomedical Applications*, 57, p.1-45, 1992.

FRANCOTTE, E.; ZHANG, T. European Patent *WO 97/04011* (Priority 21.07 1995).

FRANCOTTE, E. *Chromatography as a Separation Tool for the Preparative Resolution of Racemic Compounds*, in: S. Ahuja (Ed), *Chiral Separations: Applications and Technology*, ACS, New York, 1996.

FRANCOTTE, E.; RICHERT, P. *Applications of Simulated Moving Bed Chromatography to the Separation of the Enantiomers of Chiral Drugs*. *J. Chromatogr. A*, 769, p. 101-107, 1997.

FRANCOTTE, E. *Enantioselective chromatography: an essential and versatile tool for the*

analytical and preparative separation of enantiomers. *Chimia* 51, p.717-725, 1997.

FRANCOTTE, E. *Enantioselective chromatography as a powerful alternative for the preparation of drug enantiomers*. *J. Chromatogr. A*, 906, p. 379-397, 2001.

FOGLER, H. S. *Elements of Chemical reaction Engineering*, Rio de Janeiro: Prentice Hall do Brasil, 2nd edition, 1992, 967p.

GOLSHAN-SHIRAZI, S. E GUIOCHON, G. *Optimization of experimental conditions in preparative liquid chromatography: Trade-offs between recovery yield and production rate*. *J. Chromatogr. A*, 536, p.57-73, 1991.

GUIOCHON, G. *Fundamental of Preparative and Non-linear Chromatography*. Boston : academic Press, Ma, 1994.

HAYNES, H. W., SARMA, A. N. *Model for application of gás-chromatography to measurements of diffusion in bidispese structured catalysts*. *AIChE Journal*, 19, p. 1043 - 1046, 1973.

HE, H., Liu, Y., Sun, C., Wang, X., Pham-Huy, C. *Effect of Temperature on Enantiomers separation of Oxazepam and Lorazepam by High Performance Liquid Chromatography on a β -Cyclodextrin Derivetized Bonded Chiral Stationary Phase*. *J. of Chromatogr. Science*, 42,p. 62-66, 2004.

JUZA, M.; MAZZOTTI, M.; MORBIDELLI, M. *Simulated Moving-Bed Chromatography and Its Application to Chirotechnology*. *TIBTECH*, 18,p.108-118, 2000.

JUZA, M.; MAZZOTTI, M.; MORBIDELLI, M. *Continuous enantiomers separation of the volatile inhalation anesthetic enflurane with a gas chromatographic simulated moving bed GC-SMB unit*. *J. of Chromatogr. A*, 813, p. 333-347, 1998.

KÄRGER, J.; RUTHVEN, D. M. *Diffusion in Zeolites and other Microporous Solids*. New York: John Wiley & Sons, 1992, 605 p.

KLEMISCH, W., VON HODENBERG, A. *Separation of enantiomers on crosslinked*

- acetylcellulose* J. High. Resolut. Chromatogr. Commun., 8, p. 37-38, 1985.
- KNOX, J.H., PYPER, H.M. J. Chromatogr. A, 363, 1, 1986.
- KRAUSE, W., KÜHNE, G., SAUERBREY, N. *Pharmacokinetics of (+)- Rolipram and (-)-Rolipram in Healthy Volunteers*. Eur. J. Clin. Pharmacol, 38, p. 71-75, 1990.
- KRISTULOVIC, A.M. *Chiral Separation by HPLC, Application to Pharmaceutical Compounds*, New York: John Wiley, 1989.
- KRUK, Z. L.; PYCOCK, C. J. *Neurotransmitters and Drugs*, UK: Chapman Hall, 3th edition, 1991.
- KÜSTERS, E; SPÖNDLIN, C. *Influence of Temperature on the Enantioseparation of Rolipram and structurally related Racemates on Chiralcel-OD*. Journal of Chromatogr. A, 737, 33-337, 1996.
- KUCERA, E. J. *Contribution to theory of chromatography by linear non-equilibrium elution chromatography*. Chromatographia, 19, 237, 1965.
- MAZZOTTI, M.; STORTI, G.; MORBIDELLI, M. *Optimal operation of simulated moving bed units for nonlinear chromatographic separations*. J. Chromatogr. A, 769, p. 3-24, 1997.
- MIGLIORINI, C.; GENTILINI, A.; MAZZOTTI, M.; MORBIDELLI, M. *Design of simulated moving bed units under non-ideal conditions*. Ind. Eng. Chem. Res., 38, p. 2400-2410, 1999.
- MORRISON, R. T.; BOYD, R. N. *Organic Chemistry*, EUA: Prentice-Hall, 6th edition, 1992.
- MULZER, J. *Asymmetric Synthesis of the Novel Antidepressant Rolipram®* J. Prakt. Chem., 336, p. 287-291, 1994.
- NAGAMATSU, S.; MURAZUMI, K.; MATSUMOTO, H., MAKINO, S. *Chiral Separation of a Pharmaceutical Intermediate by a Simulated Moving Bed Process*.

J.Chromtogr. A, 832, p. 55-65, 1999.

OKAMOTO, Y., KAWASHIMA, M., HATADA, K. *Controlled chiral recognition of cellulose triphenylcarbamate derivatives supported on silica-gel.* J. Chromatogr. A, 363, p. 173-186, 1986.

OKAMOTO, Y., ABURATANI, R., HATADA, K. *Chromatographic resolution: XXI. Direct optical resolution of abscisic acid by high-performance liquid chromatography on cellulose tris(3,5-dimethylphenylcarbamate).* J. Chromatogr. A, 448, p. 454 - 455, 1988.

OKAMOTO, Y., KAIDA, Y. *Resolution by high performance liquid chromatography using polysaccharide carbamates and benzoates as chiral stationary phases.* J. Chromatogr. A, 666, 403-419, 1994.

OKAMOTO, Y., YASHIMA, E. *Polysaccharide Derivatives for Chromatographic separation of Enantiomers.* Angew. Chem. Int. Ed., 37, p.1020-1043, 1998.

PAIS, L. S.; LOUREIRO, J M.; RODRIGUES, A E. *Separation of 1,1'-bi-2-naphthol enantiomers by continuous chromatography in simulated moving bed.* Chem Eng. Sci., 52, 2, p. 245-257, 1997.

PAIS, L. S.; LOUREIRO, J M.; RODRIGUES, A E. *Separation of enantiômeros of a chiral epoxide by simulated moving bed.* J. Chromatogr. A, 827, p. 215-233, 1998.

PEDEFERRI, M.; ZENONI, G.; MAZZOTTI, M.; MORBIDELLI, M. *Experimental analysis of a chiral separation through simulated moving bed chromatography,* Chem. Eng. Sci., 54, p. 3735-3748, 1999.

PFEFFER, M., SAUERBREY, N., WINDT-HANKE, F., KRAUSE, W. *In-vitro and In-vivo Characterization of Two Sustained Release Formulations for the Antidepressant Rolipram,* Arzneimittelforschung, 40, p. 1191-1194, 1990.

PIRKLE, W.H., PORCHAPSKY, T.C. *Considerations of chiral recognition relevant to the liquid chromatographic separation of enantiomers.* Chem. Rev. 89, p.347-362, 1989.

PRELOG, V., INGOLD, C. K. *Chirality in Chemistry (Nobel Lecture)*; Science, 193, 17, 1976.

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

SANTOS, M. *Separação dos Enantiômeros do Anestésico Cetamina por Cromatografia Contínua em Leito Móvel Simulado*. Campinas: Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2004. 145 p. Tese (doutorado)

SCHMIECHEN, R., HOROWOSKI, R., PALENSCHAT, D., PASCHELKE, G., WACHTEL, H., KEHR, W. Patente U.S. 4193926, 1980.

SCHULTE, M; JOCHEN, STRUBE. *Preparative Enantioseparation by Simulated Moving Bed Chromatography*, Journal of Chromatogr. A, 906, p. 399-416, 2001.

SHIBATA, T.; OKAMOTO, I. E ISHII, K. *Chromatographic optical resolution on polysaccharides and derivatives*. J. Liq