



RAFAEL FIRMANI PERNA

**SEPARAÇÃO CROMATOGRÁFICA DOS
ENANTIÔMEROS DO FÁRMACO VERAPAMIL EM
PROCESSO CONTÍNUO MULTICOLUNAS**

CAMPINAS, SP

2013



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

RAFAEL FIRMANI PERNA

**SEPARAÇÃO CROMATOGRÁFICA DOS
ENANTIÔMEROS DO FÁRMACO VERAPAMIL EM
PROCESSO CONTÍNUO MULTICOLUNAS**

Orientador: Prof. Dr. Cesar Costapinto Santana

Co-orientador: Prof. Dr. Marco Aurélio Cremasco

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

Este exemplar corresponde à versão final da tese defendida pelo aluno Rafael Firmani Perna e orientada pelo Prof. Dr. Cesar Costapinto Santana.

A handwritten signature in blue ink, reading "Cesar Santana", is positioned above the printed name.

Prof. Dr. Cesar C. Santana

**CAMPINAS, SP
2013**

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

P422s Perna, Rafael Firmani, 1985-
Separação cromatográfica dos enantiômeros do fármaco *verapamil* em processo contínuo multicolumnas / Rafael Firmani Perna. – Campinas, SP : [s.n.], 2013.

Orientador: Cesar Costapinto Santana.
Coorientador: Marco Aurélio Cremasco.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química.

1. Enantiômeros. 2. Verapamil. 3. Quiralidade. 4. Cromatografia líquida de alta eficiência. 5. Adsorção. I. Santana, Cesar Costapinto, 1948-. II. Cremasco, Marco Aurélio, 1962-. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Química. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Chromatographic separation of verapamil enantiomers in multicolumn continuous process

Palavras-chave em inglês:

Enantiomers

Verapamil

Chirality

High performance liquid chromatography

Adsorption

Área de concentração: Desenvolvimento de Processos Biotecnológicos

Titulação: Doutor em Engenharia Química

Banca examinadora:

Cesar Costapinto Santana [Orientador]

Amaro Gomes Barreto Júnior

Antônio Carlos Luz Lisbôa

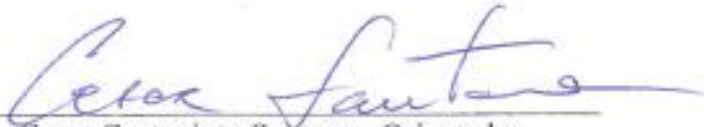
Brás Heleno de Oliveira

Vinicius de Veredas

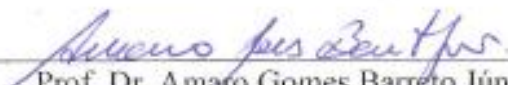
Data de defesa: 25-07-2013

Programa de Pós-Graduação: Engenharia Química

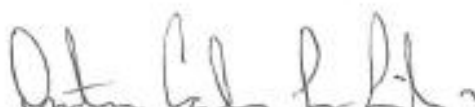
Tese de Doutorado defendida por Rafael Firmani Perna e aprovada em 25 de julho de 2013 pela banca examinadora constituída pelos doutores:



Prof. Dr. Cesar Costapinto Santana - Orientador



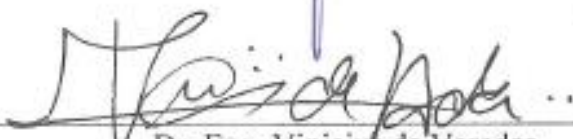
Prof. Dr. Amaro Gomes Barreto Júnior



Prof. Dr. Antônio Carlos Luz Lisboa



Prof. Dr. Brás Heleno de Oliveira



Dr. Eng. Vinicius de Veredas

Dedico esta tese...

À DEUS pela capacitação;

Aos meus pais, Celso e Márcia, com todo o meu respeito e admiração;

A minha noiva Denise, pelo amor, carinho e compreensão;

A minha avó Zinha, pelo afeto e pelas orações;

Aos meus irmãos, Fabrício e Layra Maria;

Aos meus familiares e amigos;

*E a todos aqueles que fazem da pesquisa científica uma ferramenta
benéfica à humanidade*

Agradecimentos

Agradecer é um momento de muita satisfação! O difícil é se lembrar de todos aqueles que contribuíram, direta ou indiretamente, com o desenvolvimento deste incansável e prazeroso trabalho.

À Deus, em primeiro lugar, pelo dom da vida, pelo seu amor incondicional e por me proporcionar saúde, serenidade e paz. Obrigado, Senhor, por iluminar-me e me amparar em todos os momentos de dificuldade!

A minha família por todo o apoio e compreensão!

Ao professor Cesar C. Santana pela oportunidade concedida para a realização do doutorado, pela paciência, pelos conselhos e pela efetiva orientação desta tese, desde a concepção do projeto de pesquisa até a sua redação final. Muito obrigado!

Ao professor Marco A. Cremasco, pelo profissionalismo e pela constante coorientação! Obrigado pelas sugestões!

Aos professores Antônio Carlos Luz Lisboa, desta Faculdade, e José Alberto Fracassi (Instituto de Química, UNICAMP) pela atenção, disposição e pelas preciosas sugestões apontadas nos exames de qualificação. A minha sincera gratidão!

Ao professor Marco Mazzotti do *Separation Process Laboratory*, por me conceder a oportunidade de estagiar em um dos melhores institutos de pesquisa do mundo, o *Swiss Federal Institute of Technology* (ETH/Zurich), na Suíça. Experiência única em fazer parte de uma equipe de pesquisadores consagrados no assunto e adquirir um vasto e rico conhecimento intelectual e, principalmente, de vida!

Ao professor Carlos R. D. Correia (Instituto de Química, UNICAMP), por disponibilizar as instalações do Laboratório de Síntese de Substância Bioativas para auxílio dos experimentos. Muito obrigado ao amigo Airton G. Salles Jr., pela contribuição, pelo apoio e pelas idéias fantásticas apontadas na etapa inicial deste trabalho.

A professora Katia Tannous pela oportunidade de desenvolvimento do Estágio à Docência, pelos valiosos conselhos e, principalmente, pela atenção! Uma grande amiga!

A todos os professores da Faculdade de Engenharia Química da UNICAMP, responsáveis pelo meu crescimento profissional e intelectual!

Aos funcionários da Faculdade de Engenharia Química da UNICAMP que, de alguma forma, contribuíram para a execução e conclusão da minha tese. Em especial ao amigo Gilson e a secretária Regina, por se mostrarem solícitos em todos os momentos.

A Denise C. Saraceni, em especial, por fazer parte de um importante capítulo da minha história, dividindo sonhos, multiplicando alegrias, compartilhando momentos e fortalecendo-me constantemente!

Aos amigos e companheiros do Laboratório de Biosseparações: Absolon Carvalho, Carla Aiolfi, Ana Carolina Nascimento, Anayla Sousa, Luisa Sepúlveda, Alex Ramos, Jean V. Moreira, Carlos Oliveira e Wilson M. Ferrari. Caros amigos, obrigado pela convivência harmoniosa, pelos momentos inesquecíveis, pelas discussões e, principalmente, pelo compartilhamento de conhecimento científico e experiência de vida! Fui integrante de uma equipe apaixonada pela Ciência !

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo suporte financeiro.

Minha sincera gratidão a todos !

Muito Obrigado!

Rafael Firmani Perna

Campinas, 25 de julho de 2013.

“Determinação, coragem e autoconfiança são fatores decisivos para o sucesso. Se estamos possuídos por uma inabalável determinação conseguiremos superá-los. Independentemente das circunstâncias devemos ser sempre humildes, recatados e despidos de orgulho.”

Tenzin Gyatso (Dalai Lama)

Resumo

O fármaco racêmico verapamil tem sido utilizado no tratamento de doenças cardiovasculares relacionadas à hipertensão arterial, arritmias supraventriculares e angina pectoris. Seus enantiômeros apresentam biodisponibilidades distintas e exibem diferentes propriedades farmacológicas. O enantiômero *S*-(-)-*verapamil* apresenta maior potencial cardiovascular quando comparado ao seu antípoda óptico *R*-(+)-*verapamil*; este, por sua vez, exibe ação antitumoral, atuando como inibidor hepatocarcinogênico.

Diante deste contexto, o presente trabalho teve como objetivo a determinação de parâmetros envolvidos na separação dos enantiômeros do fármaco em escala semi-preparativa visando obtê-los, opticamente puros, em unidade cromatográfica contínua do tipo leito móvel simulado. O desenvolvimento da separação ocorreu em colunas quirais recheadas com fase estacionária tris (3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose utilizando a mistura de *n*-hexano, isopropanol, etanol e dietilamina (90: 5: 5: 0,1 %, em volume) como fase móvel.

Experimentos de pulsos com soluções diluídas dos enantiômeros do verapamil foram realizados para diferentes temperaturas (15 a 35 °C) e vazões (1,0 a 2,5 mL min⁻¹) visando determinar as constantes de equilíbrio de adsorção (constantes de Henry) e os parâmetros cromatográficos, termodinâmicos e de transferência de massa; ao passo que, experimentos com soluções diluídas dos traçadores (compostos inertes) foram realizados para se obter as porosidades do sistema. Os fatores de retenção apresentaram valores considerados ideais para separações enantioméricas (2,0 < *k* < 6,0) para vazões e temperaturas avaliadas. Com relação à seletividade e resolução cromatográficas, foram obtidos valores de 1,34 e 1,70, respectivamente, para temperatura de 25 °C e vazão de 1,0 mL min⁻¹, o que comprova a completa separação dos enantiômeros na coluna semi-preparativa. As constantes de Henry apresentaram-se relativamente elevadas, sendo que o enantiômero *R*-(+)-*verapamil* apresentou maior afinidade pela fase estacionária com maiores valores para a constante de equilíbrio de adsorção. O coeficiente de dispersão axial sofreu pouca variação entre os enantiômeros; entretanto, o coeficiente de transferência de massa global foi considerado relativamente rápido com valores superiores a 65,70 e 45,32 min⁻¹ para os

enantiômeros *S*-(-) e *R*-(+), respectivamente. Os parâmetros termodinâmicos confirmaram a maior afinidade do *R*-(+)-*verapamil* pela coluna quiral com maiores valores negativos de entalpia de adsorção. Constatou-se também que os fenômenos entálpicos regem a separação enantiomérica na fase estacionária avaliada.

Experimentos com soluções concentradas da mistura racêmica foram realizados com a finalidade de se determinar as isotermas de adsorção competitivas e os perfis de eluição sob condições de sobrecarga da coluna cromatográfica. As isotermas de adsorção apresentaram comportamento não-linear para a faixa de concentração utilizada e foram satisfatoriamente ajustadas ao modelo de Langmuir Competitivo Modificado. O estudo de sobrecarga mostrou a possibilidade da separação do *verapamil* racêmico nas escalas semi-preparativa e preparativa.

Finalmente, foram determinados os parâmetros operacionais do processo contínuo multicolunas para os modos VARICOL® e LMS e, obtidos os valores das variáveis de desempenho (pureza, produtividade, recuperação e consumo de solvente) das respectivas unidades. Os resultados obtidos mostraram-se promissores à separação dos enantiômeros do *verapamil* e, de fato, representaram o primeiro conjunto de dados experimentais em escala mundial decorrentes do uso da cromatografia contínua operada em leito móvel simulado.

Palavras-chave: enantiômeros; *verapamil*; separação cromatográfica quiral; leito móvel simulado; Varicol.

Abstract

The racemic drug verapamil has been used in the treatment of cardiovascular diseases related to hypertension, supraventricular arrhythmias, and angina pectoris. Its enantiomers have different bioavailability and pharmacological properties. The *S*-(-)-*verapamil* presents more cardiovascular potential when compared to its optical antipode *R*-(+)-*verapamil*. This, in turn, exhibits antitumor activity, acting as a hepatocarcinogenic inhibitor.

Given this context, the present study aimed to determine the parameters involved in the separation of the enantiomers of the drug in semi-preparative scale in order to obtain them, optically pure, in continuous chromatographic unit type simulated moving bed. The development occurred in separation columns packed with chiral stationary phase amylose tris (3,5-dimethylphenylcarbamate) using a mixture of *n*-hexane, isopropanol, ethanol, and diethylamine (90: 5: 5: 0.1 %, by volume) as mobile phase.

Pulse experiments with dilute solutions of the verapamil enantiomers were performed at different temperatures (15 to 35 °C) and flow rates (1.0 to 2.5 mL min⁻¹) to determine the equilibrium constants adsorption (Henry's constants) and chromatographic, thermodynamic, and mass transfer parameters; whereas experiments with dilute solutions of the tracers (inert compound) were performed to obtain the porosity of the system. The capacity factors had values considered ideal for enantiomeric separations ($2.0 < k < 6.0$) for the flow rate and temperature evaluated. Regarding the chromatographic selectivity and resolution values of 1.34 and 1.70 were obtained, respectively, for temperature of 25 °C and flow rate of 1.0 mL min⁻¹, which proves the complete separation of the enantiomers in the semi-preparative column. Henry's constants were relatively high, and the *R*-(+)-*verapamil* had a higher affinity for the stationary phase with the highest values for the adsorption equilibrium constant. Axial dispersion coefficient showed little variation between the enantiomers; however, the overall mass transfer coefficient was considered relatively fast to values of 65.70 and 45.32 min⁻¹ to *S*-(-) and *R*-(+) enantiomers, respectively. Thermodynamics parameters confirm the major affinity of *R*-(+)-*verapamil* with high negative

values of adsorption enthalpy. It was also found that the enthalpic phenomena govern the enantiomeric separation.

Experiments with concentration solutions of the racemic mixture were conducted in order to determine the competitive adsorption isotherm, and the elution profiles under overload conditions of the chromatographic column. The competitive isotherms showed a nonlinear behavior to the range of concentration investigated and the Langmuir Competitive Modified model represents satisfactorily the adsorption data. The study of overload of the column carried through in high concentration showed the possibility of the separation of racemic verapamil using semi-preparative and preparative scale.

Finally, the operating parameters of the multicolumn continuous process (VARICOL® and LMS units), and the values of the performance variables (purity, productivity, recovery, and solvent consumption) were determined. The results obtained were promising to the separation of the verapamil enantiomers and, in fact, represented the first set of experimental data worldwide from the use of the continuous chromatography operated in simulated moving bed.

Keywords: enantiomers; verapamil; chiral chromatographic separation; simulated moving bed; Varicol.

Lista de Figuras

Figura 1.	Representação esquemática de moléculas quirais. Observa-se que as moléculas relacionam-se umas com a outras da mesma forma que a mão esquerda se relaciona com mão direita, ou seja, não se superpõem.....	09
Figura 2.	Estrutura molecular dos enantiômeros do verapamil: (A) (<i>S</i>)-(-)-verapamil; (B) (<i>R</i>)-(+)-verapamil.....	11
Figura 3.	Representação esquemática do local de ligação do verapamil ao canal de cálcio (tipo L).....	12
Figura 4.	Esquema básico de um equipamento de CLAE: (1) Reservatório de fase móvel; (2) Bomba de fase móvel; (3) Injetor; (4) Seringa de injeção; (5) Coluna cromatográfica; (6) Detector; (7) Sistema de aquisição de dados; (8) Controladora; (9) Frasco de descarte.....	14
Figura 5.	Cromatograma teórico resultante da injeção de uma amostra contendo três componentes distintos. Definição dos termos cromatográficos: (t_o) tempo morto (ou tempo de retardamento) da fase móvel; (w_b , w_j) largura dos picos (entre tangentes); ($w_{h/2}$) largura do pico a meia altura; (t_{Ri} , t_{Rj}) e (t'_{Ri} , t'_{Rj}) tempos de retenção e “retenção corrigido”, respectivamente.....	16
Figura 6.	Alargamento do pico cromatográfico a partir de diferentes caminhos seguidos pelas moléculas da amostra.....	22
Figura 7.	Difusão longitudinal do soluto na fase móvel para as extremidades de concentrações mais baixas.....	22
Figura 8.	Transferência de massa envolvendo o efeito do tamanho de partícula e viscosidade da fase móvel.....	23
Figura 9.	Variação da altura equivalente a um prato teórico (<i>HETP</i>) com a velocidade intersticial (u) da fase móvel de acordo com a equação de van Deemter.....	24

Figura 10.	Estrutura química das β -ciclodextrinas.....	30
Figura 11.	Estruturas químicas das fases estacionárias do tipo “Pirkle”: a) 3,5-dinitrobenzoilfenilglicina, b) naftilalanina e c) (S,S) Whelk-O [®] 1.....	31
Figura 12.	Complexação ternária estereosseletiva.....	32
Figura 13.	Fases estacionárias derivadas de fenilcarbamatos de amilose e celulose: (1a) <i>tris(3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose</i> e (2a) <i>tris(3,5-dimetilfenilcarbamato) de celulose</i>	36
Figura 14.	Curva de ruptura para uma mistura binária: indicações dos tempos de retenção das frentes de adsorção e das concentrações durante eluição para uma concentração de alimentação conhecida.....	40
Figura 15.	Diagrama esquemático de operação do sistema leito móvel verdadeiro (LMV). (●) Composto menos retido – refinado; (■) Composto mais retido – extrato.....	50
Figura 16.	Esquema das quatro seções de uma unidade de Leito Móvel Verdadeiro (LMV) em uma separação binária. (A) composto menos retido; (B) composto mais retido.....	51
Figura 17.	Esquema das quatro seções de uma unidade de Leito Móvel Simulado (LMS) de configuração 3-3-3-3 para separação contínua. (●) composto menos retido; (■) composto mais retido...	53
Figura 18.	Representação esquemática do processo VARICOL [®]	54
Figura 19.	Esquema do funcionamento geral do VARICOL [®] com relação à entrada e saída das correntes em cada zona de separação.....	55
Figura 20.	Estrutura molecular dos compostos (a) TTBB e (b) poliestireno....	60
Figura 21.	Estrutura química da fase estacionária quiral tris (3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose.....	61
Figura 22.	Representação esquemática do aparato experimental do sistema de cromatografia líquida de alta eficiência.....	62
Figura 23.	Unidade cromatográfica contínua: (A) visão externa; (B) visão interna.....	64

Figura 24.	Visualização gráfica dos tempos de retenção à meia altura da frente dos picos cromatográficos obtidos para os enantiômeros sob condições de sobrecarga da coluna.....	72
Figura 25.	Janela de dados de entrada referentes aos parâmetros geométricos da coluna e de injeção analítica.....	73
Figura 26.	Janela de dados de entrada e saída referentes às medidas de sobrecarga e aos parâmetros da isoterma de adsorção.....	73
Figura 27.	Dados do comportamento hidrodinâmico do processo referentes à eficiência da coluna e queda de pressão.....	75
Figura 28.	Dados referentes ao processo e a alimentação da mistura racêmica.....	75
Figura 29.	Dados referentes aos parâmetros operacionais a serem introduzidos na unidade de separação cromatográfica contínua multicolumnas.....	76
Figura 30.	Resolução (■) e seletividade (□) em função da variação da proporção alcoólica da mistura. As proporções de <i>n</i> -hexano e dietilamina foram fixadas a 90 % (em volume) e 0,1 % (em volume), respectivamente.....	80
Figura 31.	Fatores de retenção dos enantiômeros de verapamil em função da variação da proporção alcoólica da mistura. (●) fator de retenção do <i>S</i> -(-)- <i>verapamil</i> ; (○) fator de retenção do <i>R</i> -(+)- <i>verapamil</i> . As proporções de <i>n</i> -hexano e dietilamina foram fixadas a 90 % e 0,1 % (em volume), respectivamente.....	80
Figura 32.	Avaliação da queda de pressão na coluna cromatográfica Chiralpak® AD (100 x 10 mm; 20 µm).....	81
Figura 33.	Primeiro momento para o composto inerte TTBB: determinação da porosidade total da coluna cromatográfica.....	84
Figura 34.	Primeiro momento para o composto inerte poliestireno: determinação da porosidade do leito.....	84

Figura 35.	Perfil de eluição do composto inerte (a) TTBB e dos enantiômeros (b) <i>S</i> -(-)- <i>verapamil</i> e (c) <i>R</i> -(+)- <i>verapamil</i> . Condições experimentais: concentração racêmica, 0,5 mg mL ⁻¹ ; fase móvel, <i>n</i> -hexano: isopropanol: etanol: dietilamina (90: 5: 5: 0,1 %, v/v/v/v); fase estacionária, tris (3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose; vazão, 1,0 mL min ⁻¹ ; detecção, 270 nm; temperatura, 25 °C; volume de injeção, 20 µL.....	85
Figura 36.	Perfis de eluição dos enantiômeros <i>S</i> -(-)- <i>verapamil</i> e <i>R</i> -(+)- <i>verapamil</i> em diferentes temperaturas. Condições experimentais: concentração racêmica, 0,5 mg mL ⁻¹ ; fase móvel, <i>n</i> -hexano: isopropanol: etanol: dietilamina (90: 5: 5: 0,1 %, v/v/v/v); fase estacionária, tris (3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose; vazão, 1,0 mL min ⁻¹ ; detecção, 270 nm; temperatura, 25 °C; volume de injeção, 20 µL.....	86
Figura 37.	Variações do tempo de retenção dos enantiômeros (A) <i>S</i> -(-)- <i>verapamil</i> e (B) <i>R</i> -(+)- <i>verapamil</i> em função da temperatura para diferentes vazões de fase móvel. (◇) 1,0 mL min ⁻¹ ; (□) 1,5 mL min ⁻¹ ; (Δ) 2,0 mL min ⁻¹ ; e (○) 2,5 mL min ⁻¹	87
Figura 38.	Efeito da vazão e da temperatura na resolução dos enantiômeros de <i>verapamil</i> . <i>Legenda:</i> 15 °C (cinza); 20 °C (preto); 25 °C (verde); 30 °C (azul); 35 °C (vermelho). <i>Condições experimentais:</i> concentração racêmica, 0,5 mg mL ⁻¹ ; fase móvel, <i>n</i> -hexano: isopropanol: etanol: dietilamina (90: 5: 5: 0,1 %, v/v/v/v); fase estacionária, tris (3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose; vazão, 1,0 mL min ⁻¹ ; detecção, 270 nm; volume de injeção, 20 µL.....	90
Figura 39.	Aplicação do método do primeiro momento para a determinação das constantes de equilíbrio de adsorção para o enantiômero <i>S</i> -(-)- <i>verapamil</i> nas temperaturas de 15 °C (cinza), 20 °C (preto), 25 °C (verde), 30 °C (azul) e 35 °C (vermelho).....	91
Figura 40.	Aplicação do método do primeiro momento para a determinação das constantes de equilíbrio de adsorção para o enantiômero <i>R</i> -(+)- <i>verapamil</i> nas temperaturas de 15 °C (cinza), 20 °C (preto), 25 °C (verde), 30 °C (azul) e 35 °C (vermelho).....	92

Figura 41.	Gráfico de van Deemter para o enantiômero <i>S</i> -(-)- <i>verapamil</i> nas temperaturas de 15 °C (cinza), 20 °C (preto), 25 °C (verde), 30 °C (azul) e 35 °C (vermelho).....	95
Figura 42.	Gráfico de van Deemter para o enantiômero <i>R</i> -(+)- <i>verapamil</i> nas temperaturas de 15 °C (cinza), 20 °C (preto), 25 °C (verde), 30 °C (azul) e 35 °C (vermelho).....	95
Figura 43.	Dependência dos fatores de retenção (<i>k</i>) dos enantiômeros (●) <i>S</i> -(-)- <i>verapamil</i> e (○) <i>R</i> -(+)- <i>verapamil</i> com a temperatura. Vazão: 1,0 mL min ⁻¹	99
Figura 44.	Dependência do fator de separação (α) dos enantiômeros do verapamil com a temperatura. Vazão: 1,0 mL min ⁻¹	99
Figura 45.	Perfis de eluição do verapamil em condições de sobrecarga. Volumes de injeção: 20 µL (preto); 50 µL (vermelho); 100 µL (azul); 200 µL (verde); 500 µL (laranja); 600 µL (cinza); e 800 µL (roxo). Fase móvel, <i>n</i> -hexano: isopropanol: etanol: dietilamina 90:5:5:0,1% (v/v/v/v); vazão, 1,0 mL min ⁻¹ ; detecção, 260 nm; temperatura, 25 °C; concentração, 10 g L ⁻¹	101
Figura 46.	Dados referentes aos parâmetros geométricos da coluna cromatográfica e resultados experimentais decorrentes da injeção analítica.....	103
Figura 47.	Dados experimentais dos tempos de retenção à meia altura das frentes dos picos de eluição obtidos em condições de sobrecarga da coluna e, parâmetros das equações das isotermas, obtidos por simulação.....	104
Figura 48.	Isotermas de adsorção simuladas para os enantiômeros do verapamil na temperatura de 25 °C utilizando-se coluna Chiralpak® AD(100 x 10 mm, 20 µm).....	105
Figura 49.	Curvas de ruptura do verapamil racêmico nas concentrações de alimentação iguais a 2,5 g L ⁻¹ (vermelho) e 5,0 g L ⁻¹ (preto) para vazão de 2,0 mL min ⁻¹ e temperatura de 25°C.....	107
Figura 50.	Derivada primeira das curvas de ruptura para obtenção dos tempos de retenção das frentes de adsorção (<i>tr</i> ₁ e <i>tr</i> ₂). Os valores de <i>tr</i> ₁ e <i>tr</i> ₂ para as concentrações de 2,5 g L ⁻¹ (vermelho) e 5,0 g L ⁻¹ (preto) correspondem aos pontos de máximo das curvas.....	108

Figura 51.	Perfis de concentrações dos enantiômeros (●) <i>S</i> -(-)- <i>verapamil</i> e (○) <i>R</i> -(+)- <i>verapamil</i> obtidos durante a eluição da mistura racêmica nas concentrações de alimentação 2,5 gL ⁻¹ (vermelho) e 5,0 g L ⁻¹ (preto).....	108
Figura 52.	Isotermas de adsorção competitivas do verapamil obtidas por experimentos de análise frontal a vazão de 2,0 mL min ⁻¹ para temperatura de 25 °C. (●) <i>S</i> -(-)- <i>verapamil</i> e (○) <i>R</i> -(+)- <i>verapamil</i> . Dados experimentais ajustados ao modelo de <i>Langmuir competitivo modificado</i>	109
Figura 53.	Comparação entre as isotermas de adsorção competitivas obtidas, experimentalmente, pelo método da análise frontal ((●) <i>S</i> -(-)- <i>verapamil</i> ; (○) <i>R</i> -(+)- <i>verapamil</i>) e determinadas, a partir de simulações, pelo software <i>HELP</i> [®] (linha azul – <i>S</i> -(-)- <i>verapamil</i> ; linha vermelha – <i>R</i> -(+)- <i>verapamil</i>).....	112
Figura 54.	Dados referentes à análise hidrodinâmica envolvendo a eficiência da coluna.....	113
Figura 55.	Dados referentes às condições operacionais da unidade e às características da alimentação do processo.....	114
Figura 56.	Dados de parâmetros operacionais propostos pelo software <i>HELP</i> [®] e introduzidos na unidade VARICOL [®]	114
Figura 57.	Purezas dos enantiômeros (●) <i>S</i> -(-)- <i>verapamil</i> e (○) <i>R</i> -(+)- <i>verapamil</i> na corrente de extrato, obtidas ao decorrer dos ciclos de operação da unidade VARICOL [®]	117
Figura 58.	Purezas dos enantiômeros (●) <i>S</i> -(-)- <i>verapamil</i> e (○) <i>R</i> -(+)- <i>verapamil</i> na corrente de refinado, obtidas ao decorrer dos ciclos de operação da unidade VARICOL [®]	117
Figura 59.	Cromatograma obtido para análise de pureza do enantiômero <i>R</i> -(+)- <i>verapamil</i> na corrente de extrato. Fase móvel, <i>n</i> -hexano: isopropanol: etanol: dietilamina (90: 5: 5: 0,1 %, v/v/v/v); coluna analítica Chiralpak [®] AD (250 x 4,6 mm, 10 μm); vazão, 1,0 mL min ⁻¹ ; detecção, 270nm; volume de injeção, 20 μL.....	118
Figura 60.	Cromatograma obtido para análise de pureza do enantiômero <i>S</i> -(-)- <i>verapamil</i> na corrente de refinado. Fase móvel, <i>n</i> -hexano: isopropanol: etanol: dietilamina (90: 5: 5: 0,1 %, v/v/v/v); coluna analítica Chiralpak [®] AD (250 x 4,6 mm, 10 μm); vazão,	

	1,0 mL min ⁻¹ ; detecção, 270 nm; volume de injeção, 20 µL.....	119
Figura 61.	Perfis internos de concentração simulados pelo <i>HELP</i> ® para as correntes de extrato (linha verde) e refinado (linha vermelha) e, obtidos experimentalmente, durante a separação dos enantiômeros (●) <i>S</i> -(-)- <i>verapamil</i> e (○) <i>R</i> -(+)- <i>verapamil</i> no ciclo operacional 30.....	120
Figura 62.	Purezas dos enantiômeros (●) <i>S</i> -(-)- <i>verapamil</i> e (○) <i>R</i> -(+)- <i>verapamil</i> na corrente de extrato, obtidas ao decorrer dos ciclos de operação da unidade LMS.....	123
Figura 63	Purezas dos enantiômeros (●) <i>S</i> -(-)- <i>verapamil</i> e (○) <i>R</i> -(+)- <i>verapamil</i> na corrente de refinado, obtidas ao decorrer dos ciclos de operação da unidade LMS.....	123
Figura 64	Cromatograma obtido para análise de pureza do enantiômero <i>R</i> -(+)- <i>verapamil</i> na corrente de extrato. Fase móvel, <i>n</i> -hexano: isopropanol: etanol: dietilamina (90: 5: 5: 0,1 %, v/v/v/v); coluna analítica Chiralpak® AD (250 x 4,6 mm, 10 µm); vazão, 1,0 mL min ⁻¹ ; detecção, 270 nm; volume de injeção, 20 µL.....	124
Figura 65.	Cromatograma obtido para análise de pureza do enantiômero <i>S</i> -(-)- <i>verapamil</i> na corrente de refinado. Fase móvel, <i>n</i> -hexano: isopropanol: etanol: dietilamina (90: 5: 5: 0,1 %, v/v/v/v); coluna analítica Chiralpak® AD (250 x 4,6 mm, 10 µm); vazão, 1,0 mL min ⁻¹ ; detecção, 270 nm; volume de injeção, 20 µL.....	125
Figura 66.	Perfis internos de concentração simulados pelo <i>HELP</i> ® para as correntes de extrato (linha verde) e refinado (linha vermelha) e, obtidos experimentalmente, durante a separação dos enantiômeros (●) <i>S</i> -(-)- <i>verapamil</i> e (○) <i>R</i> -(+)- <i>verapamil</i> no ciclo 23..	126
Figura 67.	Espectro de absorção no UV-VIS para a mistura racêmica do fármaco <i>verapamil</i> (0,5 mg mL ⁻¹).....	153
Figura 68.	Curva analítica para o enantiômero <i>S</i> -(-)- <i>verapamil</i>	155
Figura 69.	Curva analítica para o enantiômero <i>R</i> -(+)- <i>verapamil</i>	155

Lista de Tabelas

Tabela 1.	Fases estacionárias baseadas em polissacarídeos mais utilizadas para separações nas escalas semi-preparativa e preparativa.....	35
Tabela 2.	Cálculo do número médio de colunas nas zonas do VARICOL® (Configuração do leito cromatográfico de acordo com a Figura 19).....	56
Tabela 3.	Variáveis de desempenho avaliadas no processo Leito Móvel.....	57
Tabela 4.	Proporção de solventes na mistura e seus respectivos parâmetros cromatográficos (resolução e seletividade) para seleção da fase móvel.....	78
Tabela 5.	Dados de pressão para a coluna semi-preparativa Chiralpak® AD	82
Tabela 6.	Valores das porosidades total, do leito e das partículas determinados, experimentalmente, para coluna Chiralpak® AD (100 x 10 mm; 20 µm).....	83
Tabela 7.	Parâmetros cromatográficos de separação do verapamil na coluna quiral Chiralpak® AD (10 x 100 mm; 20 µm) a diferentes vazões e temperaturas.....	89
Tabela 8.	Valores das constantes de equilíbrio de adsorção (constantes de Henry , <i>He</i>) para os enantiômeros do verapamil em diferentes temperaturas.....	92
Tabela 9.	Número de pratos em diferentes temperaturas e vazões de fase móvel para os enantiômeros do verapamil.....	94
Tabela 10.	Coeficientes <i>A</i> e <i>C</i> da equação de van Deemter para os enantiômeros do verapamil.....	96
Tabela 11.	Coeficientes de dispersão axial e de transferência de massa global para os enantiômeros do verapamil.....	96

Tabela 12.	Parâmetros termodinâmicos da separação dos enantiômeros do verapamil em coluna quiral Chiralpak® AD.....	100
Tabela 13.	Tempos de retenção à meia altura da frente dos picos cromatográficos no estudo de sobrecarga em coluna semi-preparativa Chiralpak® AD.....	102
Tabela 14.	Valores dos parâmetros das isotermas de adsorção estimados pelo <i>HELP</i> ®.....	105
Tabela 15.	Comparação entre as constantes de Henry obtidas por pulsos cromatográficos e por isotermas de adsorção simuladas a partir de dados experimentais.....	106
Tabela 16.	Valores dos parâmetros das isotermas de adsorção estimados pelo Matlab®	110
Tabela 17.	Comparação entre as constantes de Henry obtidas por pulsos cromatográficos e por isotermas de adsorção obtidas a partir da análise frontal.....	110
Tabela 18.	Parâmetros operacionais para separação dos enantiômeros do verapamil na unidade VARICOL®.....	115
Tabela 19.	Variáveis de desempenho para a separação dos enantiômeros de verapamil na unidade VARICOL®.....	116
Tabela 20.	Parâmetros operacionais para separação dos enantiômeros do verapamil na unidade LMS.....	121
Tabela 21.	Variáveis de desempenho para a separação dos enantiômeros de verapamil na unidade LMS.....	122
Tabela 22.	Frações volumétrica e molar e viscosidade dos componentes da FM.....	156
Tabela 23.	Valores dos parâmetros de interação ($G_i j$) para temperatura de 25 °C.....	158

Lista de Siglas

AF	Análise Frontal
AFPC	Análise Frontal por Pontos Característicos
AGP	Glicoproteínas ácidas
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CD	Ciclodextrinas
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CTA	Triacetato de celulose
DEA	Dietilamina
DMSO	Dimetilsulfóxido
EPC	Eluição por Pontos Característicos
EtOH	Etanol
FDA	Food and Drug Administration
FEQ	Fase estacionária quiral
FM	Fase móvel
FML	Força Motriz Linear
HETP	Altura equivalente a um prato teórico, [cm]
HEX	<i>n</i> -hexano
IPA	Isopropanol
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
LMS	Leito Móvel Simulado
LMV	Leito Móvel Verdadeiro
MP	Métodos de Perturbação
OVM	Ovomucóides
SAB	Soro de albumina bovina
SAH	Soro de albumina humana

TFA	Ácido trifluoroacético
THF	Tetrahidrofurano
TTBB	1,3,5-tri- <i>terc</i> -butil-benzeno
UOP	Universal Oil Products
UV-VIS	Ultravioleta-Visível
VARICOL	Leito Móvel Simulado com Comprimento de Zona Variável

Lista de Símbolos

LETRAS LATINAS

A	Coeficiente da equação de van Deemter (Equação 11) referente à difusão turbilhonar, [cm]
B	Coeficiente da equação de van Deemter (Equação 11) referente à difusão longitudinal, [cm ² min ⁻¹]
b, b_{ns}	Constante de equilíbrio de adsorção, [L g ⁻¹]
C	Coeficiente da equação de van Deemter (Equação 11) referente à transferência de massa, [min]
$C1, C2$	Concentração de alimentação dos enantiômeros inserida no software <i>HELP</i> ®, [g L ⁻¹]
$C_{a,i}$	Concentração do soluto i na alimentação da coluna, [g L ⁻¹]
$C_{b,i}$	Concentração do soluto i no platô superior da curva de ruptura, [g L ⁻¹]
C_i^E	Concentração do componente i na corrente de extrato, [g L ⁻¹]
C_i^F	Concentração do componente i na corrente de alimentação, [g L ⁻¹]
C_i^R	Concentração do componente i na corrente de refinado, [g L ⁻¹]
C_i	Concentração do soluto i na fase líquida, [g L ⁻¹]
$C_{p,i}$	Concentração do soluto i no platô intermediário da curva de ruptura, [g L ⁻¹]
C_T	Concentração total da mistura racêmica, [g L ⁻¹]
D_L	Coeficiente de dispersão axial, [cm ² min ⁻¹]
D_m	Coeficiente de difusão molecular, [cm ² min ⁻¹]
d_p	Diâmetro de partícula, [m]
G	Parâmetro de interação entre os componentes da fase móvel
h	Parâmetro linear da Equação (23)
k	Fator de retenção
k_m	Coeficiente de transferência de massa global, [min ⁻¹]

K_p, H_e	Constante de equilíbrio de adsorção linear – Constante de Henry
L	Comprimento da coluna, [cm]
n_m	Quantidade de moléculas presentes na fase móvel (eluente)
N_p	Número de pratos da coluna
n_s	Quantidade de moléculas presente na fase estacionária (adsorvente)
Q_E, Q_{ext}	Vazão volumétrica da corrente de extrato, [mL min ⁻¹]
Q^F, Q_{feed}	Vazão volumétrica da corrente de alimentação, [mL min ⁻¹]
Q^I	Vazão volumétrica da seção (ou zona) I, [mL min ⁻¹]
q_i	Concentração do soluto i na fase estacionária, [g L ⁻¹]
Q_R, Q_{raff}	Vazão volumétrica da corrente de refinado, [mL min ⁻¹]
Q_{rec}	Vazão volumétrica da corrente de reciclo, [mL min ⁻¹]
q_s, q_{ns}	Capacidade de saturação do adsorvente, [g L ⁻¹]
R	Constante universal dos gases ideais, [8,314472 J mol ⁻¹ K ⁻¹]
r^2	Coefficiente de determinação
R_s	Resolução
T	Temperatura, [°C, K]
t'_R	Tempo de retenção corrigido, [min]
t_0	Tempo morto (ou de retardamento), [min]
t_1	Tempo de retenção da primeira frente de adsorção na curva de ruptura, [min]
t_2	Tempo de retenção da segunda frente de adsorção na curva de ruptura, [min]
t_{inj}	Tempo de injeção, [min]
T_{iso}	Temperatura de isoenantiosseletividade, [°C, K]
t_R	Tempo de retenção, [min]
$tr1, tr2$	Tempo de retenção dos enantiômeros à meia altura das frentes dos picos de eluição, [min]
u	Velocidade intersticial da fase móvel, [cm min ⁻¹]
v	Velocidade superficial da fase móvel, [cm min ⁻¹]
V_{ads}	Volume de adsorvente, [L]
V_{inj}	Volume de injeção, [μL]
w	Largura dos picos cromatográficos entre tangentes

$w_{h/2}$	Largura do pico cromatográfico a meia altura
x	Fração molar dos componentes da fase móvel
z	Distância longitudinal da coluna, [cm]

LETRAS GREGAS

μ_1	Primeiro momento
μ_2	Segundo momento
α	Fator de separação (ou seletividade)
α_D	Rotação óptica específica
β	Coeficiente de Kozeny
γ	Adsortividade
γ_1, γ_2	Constantes da Equação (14)
$\Delta(\Delta G)$	Diferença da variação da energia livre de Gibbs molar, [J mol ⁻¹]
$\Delta(\Delta H)$	Diferença da variação da entalpia molar de adsorção, [kJ mol ⁻¹]
$\Delta(\Delta S)$	Diferença da variação da entropia molar de adsorção, [J K ⁻¹ mol ⁻¹]
ΔG	Variação da energia livre de Gibbs molar, [J mol ⁻¹]
ΔH	Variação da entalpia molar de adsorção, [kJ mol ⁻¹]
ΔP	Variação de pressão, [bar]
ΔS	Variação da entropia molar de adsorção, [J K ⁻¹ mol ⁻¹]
ε	Porosidade do leito
ε_p	Porosidade da partícula
ε_T	Porosidade total
η	Viscosidade dos componentes individuais da fase móvel, [cP]
η_m	Viscosidade da fase móvel, [g cm ⁻¹ s ⁻¹ ; cP]
κ	Permeabilidade do leito, [cm ²]
σ^2	Variância
φ	Razão entre os volumes de fase estacionária e fase móvel
ψ	Coeficiente angular (ou inclinação da reta)
λ	Comprimento de onda, [nm]

Sumário

Capítulo 1. INTRODUÇÃO.....	01
1.1. Definição do problema.....	01
1.2. Motivação.....	03
1.3. Objetivos.....	06
 Capítulo 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	 07
2.1. Fundamentos de estereoquímica.....	07
2.1.1. Considerações gerais.....	07
2.1.2. Estereoquímica.....	08
2.1.3. Enantiômeros.....	08
2.2. Verapamil.....	10
2.2.1. Considerações gerais sobre o fármaco.....	10
2.2.2. Farmacodinâmica: mecanismo de ação.....	11
2.2.3. Farmacocinética.....	12
2.3. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	13
2.3.1. A técnica.....	13
2.3.2. Parâmetros cromatográficos de separação.....	15
2.3.3. Método dos momentos.....	19
2.3.4. Altura equivalente a um prato teórico (<i>HETP</i>).....	21
2.4. Cromatografia líquida quiral.....	26
2.4.1. Breve relato.....	26
2.4.2. Fases estacionárias quirais (FEQ).....	27

2.4.3.	Fases estacionárias polissacarídicas.....	32
2.4.3.1.	Considerações gerais.....	32
2.4.3.2.	Breve relato sobre a fase estacionária.....	34
2.5.	Isotermas de adsorção	37
2.5.1.	Considerações gerais.....	37
2.5.2.	Método da análise frontal (AF).....	38
2.5.3.	Modelos de isotermas de adsorção.....	40
2.5.4.	Análise termodinâmica de adsorção.....	43
2.6.	Sobrecarga da coluna cromatográfica	45
2.7.	Modelagem matemática da coluna cromatográfica quiral	47
2.8.	Princípios básicos da tecnologia de leito móvel	49
2.9.	Estimativa da queda de pressão	57
	 Capítulo 3. MATERIAIS E MÉTODOS	 59
3.1.	MATERIAIS	59
3.1.1.	O verapamil.....	59
3.1.2.	Compostos inertes.....	59
3.1.3.	Solventes orgânicos.....	60
3.1.4.	Fase estacionária quiral.....	61
3.1.5.	Aparelhagem experimental.....	61
3.1.5.1.	Cromatógrafo a líquido.....	61
3.1.5.2.	Unidade cromatográfica contínua.....	63
3.2.	MÉTODOS	64
3.2.1.	EXPERIMENTOS PRELIMINARES	
3.2.1.1.	Seleção e <i>screening</i> da fase móvel.....	64
3.2.1.2.	Análise da resposta do sistema de detecção.....	65

3.2.1.3.	Avaliação da queda de pressão.....	65
3.2.2.	EXPERIMENTOS COM SOLUÇÕES DILUÍDAS	
3.2.2.1.	Determinação das porosidades.....	66
3.2.2.2.	Determinação dos parâmetros cromatográficos.....	67
3.2.2.3.	Determinação das constantes de equilíbrio de adsorção: constantes de Henry.....	68
3.2.2.4.	Determinação dos coeficientes de dispersão axial e de transferência de massa global.....	68
3.2.2.5.	Determinação dos parâmetros termodinâmicos de adsorção.....	69
3.2.3.	EXPERIMENTOS COM SOLUÇÕES CONCENTRADAS	
3.2.3.1.	Estudo de sobrecarga na coluna.....	69
3.2.3.2.	Determinação das isotermas de adsorção.....	70
3.2.3.3.	Obtenção dos parâmetros operacionais e das variáveis de desempenho dos processos LMS e VARICOL [®]	74
3.2.3.4.	Caracterização dos enantiômeros.....	76
	Capítulo 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	77
4.1.	EXPERIMENTOS PRELIMINARES	
4.1.1.	Seleção e <i>screening</i> da fase móvel.....	77
4.1.2.	Avaliação da queda de pressão na coluna cromatográfica quiral.....	81
4.2.	EXPERIMENTOS COM SOLUÇÕES DILUÍDAS	
4.2.1.	Determinação das porosidades total, do leito e das partículas.....	82
4.2.2.	Determinação dos perfis de eluição e dos parâmetros cromatográficos de separação dos enantiômeros de verapamil em coluna Chiralpak [®] AD.....	85

4.2.3.	Determinação das constantes de equilíbrio de adsorção: constantes de Henry.....	90
4.2.4.	Eficiência de separação e parâmetros de transferência de massa.....	93
4.2.5.	Análise termodinâmica de adsorção.....	97
4.3.	EXPERIMENTOS COM SOLUÇÕES CONCENTRADAS	
4.3.1.	Perfis de eluição em condições de sobrecarga (<i>overload</i>) na coluna Chiralpak® AD.....	100
4.3.2.	Isotermas de adsorção.....	103
4.3.2.1.	Isotermas de adsorção simuladas pelo software <i>HELP</i> ®.....	103
4.3.2.2.	Isotermas de adsorção obtidas pelo método da análise frontal.....	106
4.3.2.3.	Comparação entre as isotermas de adsorção competitivas.....	111
4.3.3.	Separação cromatográfica contínua dos enantiômeros do verapamil.....	112
4.3.3.1.	Separação contínua na unidade VARICOL®.....	112
4.3.3.2.	Separação contínua na unidade LMS.....	120
	Capítulo 5. CONCLUSÕES E SUGESTÕES	127
5.1.	Conclusões finais.....	127
5.2.	Sugestões para trabalhos futuros.....	128
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	131
	Apêndice A: Espectro de absorção.....	155
	Apêndice B: Curva analítica.....	157
	Apêndice C: Viscosidade da fase móvel.....	159

Os resultados apresentados nas seções 4.3.3.1 e 4.3.3.2 desta Tese de Doutorado constituem o documento intitulado como PROCESSO DE OBTENÇÃO DOS ENANTIÔMEROS DE VERAPAMIL EM LEITO MÓVEL SIMULADO CONVENCIONAL E NÃO CONVENCIONAL e estão protegidos por patente depositada no Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI, Brasil) sob o processo BR 10 2012 019046 0.

Capítulo 1

INTRODUÇÃO

O presente trabalho de pesquisa foi realizado com o intuito de se obter os parâmetros necessários para proceder a separação dos enantiômeros do fármaco verapamil pela técnica de cromatografia líquida de alta eficiência, utilizando fase estacionária quiral tris (3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose. Neste capítulo será abordada a importância de se obter os enantiômeros separados e as motivações que incentivaram a execução deste trabalho. Ao término do capítulo, serão listados os objetivos gerais e específicos.

1.1. Definição do problema

A maioria das moléculas presentes na estrutura dos organismos vivos são quirais. Logo, a quiralidade torna-se uma propriedade intrínseca dos “blocos estruturais da vida”, isto é, de peptídeos, proteínas e polissacarídeos. Como resultado desta natureza quiral, vários sistemas biológicos, enzimas e receptores de membranas são sensíveis à estereoquímica de seus substratos e ligantes, realizando um reconhecimento seletivo dos isômeros configuracionais e interagindo diferentemente com cada um dos enantiômeros, ocasionando via de regra diferentes respostas fisiológicas. Portanto, a estereoquímica deve ser considerada quando se pesquisam e desenvolvem-se xenobióticos como agroquímicos, aditivos alimentares, sabores ou fragrância e, especialmente, fármacos racêmicos (MAIER *et al.*, 2001; SILVA Jr. *et al.*, 2006).

Estudos realizados nas últimas décadas demonstraram acentuada diferença nas atividades biológicas entre pares de enantiômeros levando-se à conscientização da necessidade em se produzir fármacos sintéticos enantiomericamente puros (SILVA JUNIOR, 2003). É comum a existência de fármacos que apresentam atividade biológica similar, porém, com potenciais

distintos entre seus enantiômeros. O uso de tais drogas, quando administrada na forma racêmica, torna-se preocupante quando um dos enantiômeros passa a exibir atividade antagonista, o que possibilita, de fato, o desencadeamento de efeitos colaterais indesejados e toxicidade (CASS *et al.*, 1997; MAIER *et al.*, 2001).

Como exemplo clássico da importância da quiralidade na indústria farmacêutica, encontra-se o caso da talidomida, comercializada como mistura racêmica, na década de 1960, como sedativo e analgésico (SILVA Jr *et al.*, 2006). Após a tragédia causada por esse fármaco, em razão do *S*-(-)-enantiômero apresentar efeitos teratogênicos, levando, por falta de conhecimento das diferenças toxicológicas entre os enantiômeros, à má formação de milhares de fetos humanos, novos modelos de estudos para fármacos quirais foram desenvolvidos (CALDWELL, 1995). A partir de então, passou-se a estudar a influência do arranjo espacial dos átomos nas moléculas na interação com macromoléculas biológicas e o quanto isso influenciava os processos bioquímicos, fisiológicos e farmacológicos (ORLANDO *et al.*, 2007). A necessidade de se obter enantiômeros individualmente separados para testes clínicos tem se tornado de extrema prioridade em pesquisas farmacêuticas e no desenvolvimento de novos fármacos (SARTOR, 2006).

Desta forma, as agências mundiais regulamentadoras de saúde, como o FDA (*Food and Drug Administration*) dos Estados Unidos e órgãos similares do Japão, Canadá e Comunidade Européia, têm colocado exigências mais rigorosas quanto à concessão de novas patentes de drogas racêmicas, exigindo documentação completa quanto aos perfis farmacodinâmico e farmacocinético dos enantiômeros individuais e de suas combinações (SILVA Jr. *et al.*, 2009). No Brasil, o controle e a legislação vigentes são regulamentados pela ANVISA (ORLANDO *et al.*, 2007).

Durante as últimas décadas, houve grande interesse quanto à obtenção de enantiômeros em sua forma opticamente pura, devido a razões científicas e econômicas, sendo a indústria farmacêutica a principal interessada (MAIER *et al.*, 2001). Entre os anos de 1992 e 2000, a produção mundial de compostos químicos opticamente puros cresceu de US\$ 30 bilhões para US\$ 100 bilhões, sendo que entre os 500 fármacos mais vendidos no mundo, 269 já eram comercializados como um único enantiômero (MAIER *et al.*, 2001; REKOSKE, 2001). Em 2001, o mercado de fármacos quirais movimentou US\$ 147 bilhões (RAMACHANDRA; SINGLA,

2002). No ano seguinte, a venda mundial de medicamentos contendo enantiômeros isolados ultrapassou a marca de US\$ 159 bilhões (SILVA Jr *et al.*, 2009) e, em 2008, os lucros atingiram a impressionante casa dos US\$ 200 bilhões (LIN *et al.*, 2011).

Dentre as técnicas voltadas para a obtenção de enantiômeros puros, destacam-se o processo de síntese enantiosseletiva, para o qual se utilizam auxiliares quirais, enzimas ou processos catalíticos estereosseletivos (FRANCOTTE, 2001) e a separação dos enantiômeros a partir da resolução de misturas racêmicas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em fase estacionária quiral (FRANCOTTE, 1994; ROSA, 2005). Aplicando-se a técnica da síntese assimétrica, torna-se possível obter o enantiômero desejado, através da elaboração de rota de síntese para ambos os enantiômeros, desenvolvendo-se duas rotas sintéticas independentes (FRANCOTTE, 2001). No entanto, o tempo requerido para o desenvolvimento desta técnica pode torná-la impraticável e não atrativa sob o ponto de vista econômico, especialmente quando se necessitam de pequenas quantidades do enantiômero. Portanto, a técnica de cromatografia líquida com fase estacionária quiral é preferível, uma vez que possibilita a obtenção dos dois enantiômeros com rapidez e, se devidamente utilizada, com alta eficiência, enquanto que na síntese assimétrica tem-se apenas a obtenção de um enantiômero (CASS *et al.*, 1997; SARTOR, 2006).

1.2. Motivação

A administração de fármacos enantiomericamente puros exhibe maior eficiência e efeitos colaterais reduzidos quando comparados a fármacos racêmicos comercializados, geralmente, como misturas equimolares de ambos os enantiômeros (FREITAS, 2009). As prováveis vantagens do uso desses fármacos seriam a redução da dose total administrada, a maior eficácia da relação dose-resposta e a minimização da toxicidade a partir do outro enantiômero (ROSA, 2005). Por razões como estas que os fármacos já comercializados como racematos estão sendo exaustivamente estudados com a finalidade de se avaliar a influência do estereoisomerismo sobre suas propriedades farmacológicas e as possíveis vantagens existentes na produção dos enantiômeros puros, levando-se também em consideração a relação custo-benefício (CASS *et al.*, 1997; FREITAS, 2009).

O verapamil é um fármaco que exibe potente e seletiva atividade bloqueadora sobre os canais de cálcio, atuando como agente eficaz no tratamento de doenças cardiovasculares tais como hipertensão, arritmias supraventriculares e angina pectoris (LANKFORD; BAI, 1995; SAWICKI, 2001; MATEUS *et al.*, 2007; YOSHIDA *et al.*, 2010; SINGHAL *et al.*, 2012). Apesar de seu mecanismo de ação residir no antagonismo do cálcio, o fármaco tem demonstrado inibição hepatocarcinogênica em teste estudados *in vitro* (WARMANN *et al.*, 2002) e *in vivo* (UEHARA *et al.*, 1993).

Os enantiômeros do fármaco verapamil diferem em suas biodisponibilidades e exibem diferentes propriedades farmacodinâmicas e farmacocinéticas no organismo (FIEGER *et al.*, 1992; ALEBIC-KOLBAH; ZAVITSANOS, 1997; BRANDSTETEROVÁ; WAINER, 1999). O enantiômero *S*-(-)-*verapamil* é cerca de 20, 15 e 5 vezes mais potente para os efeitos dromotrópico (redução da taxa de condução nóculo sinoatrial, atrioventricular), inotrópico (redução da força de contração cardíaca) e cronotrópico (redução da frequência cardíaca) negativos, respectivamente, quando comparado ao seu antípoda *R*-(+)-*verapamil* (SAWICKI, 2001; MATEUS *et al.*, 2007). Contudo, apesar do enantiômero *R*-(+)-*verapamil* revelar menor potência antiarrítmica, são relatados na literatura trabalhos que exibem sua ação anti-tumoral (FEDERSEL, 1993; CHAN, 1993; BERMUDEZ; BARRAGAT, 1996; BERNARDI *et al.*, 2003; YOSHIDA *et al.*, 2010). Portanto, os enantiômeros de verapamil apresentam potenciais distintos para atividades similares e podem, também, exibirem diferentes atividades de interesse terapêutico.

O potencial farmacológico do verapamil foi demonstrado através de estudos *in vivo* pela administração da mistura racêmica do fármaco em humanos (ECHIZEN *et al.*, 1988; EICHELBAUM *et al.*, 1984) e em animais de experimentação (McIIHENNY, 1971; SATOH *et al.*, 1980; LANKFORD; BAI, 1995; BHATTI; FOSTER, 1997; GIACOMINI *et al.*, 1985; BAI *et al.*, 1993). Também são relatados na literatura vários estudos *in vivo* que descrevem o metabolismo do fármaco como racemato, especificamente em ratos (WALLES *et al.*, 2003; SUN *et al.*, 2004). São poucos os estudos clínicos na literatura científica revelando o potencial dos enantiômeros separados, possivelmente devido ao elevado valor comercial que apresentam. A mistura racêmica do verapamil é comercializada por R\$ 403,00/grama, ao passo que seus enantiômeros puros são vendidos por R\$ 177.200,00/grama, conforme cotação fornecida pela

SIGMA-ALDRICH®. Por motivos como estes, técnicas envolvendo a enantioseparação surgem como alternativa viável e bastante atrativa, desde que se tenha disponível a mistura racêmica.

Dentre os métodos atuais de separação de enantiômeros, a cromatografia líquida de alta eficiência baseada em fases estacionárias quirais é a que tem encontrado maior aplicabilidade (CASS *et al.*, 1997; SILVA JUNIOR, 2003; ROSA, 2005; SARTOR, 2006). O método é capaz de fornecer ambos os enantiômeros com elevada pureza óptica em tempo relativamente curto e, no caso de fármacos nos estágios de desenvolvimento e formulação, possibilita a realização de testes farmacológicos com os enantiômeros individuais, devido à obtenção considerável, em massa, dos mesmos (FRANCOTTE, 2001; SILVA JUNIOR *et al.*, 2006). Os métodos cromatográficos analíticos podem ser ampliados a uma escala preparativa ou até mesmo para processos cromatográficos contínuos de enantioseparação utilizando-se as tecnologias *Leito Móvel Simulado* (LMS) e *Leito Móvel Simulado com Comprimento de Zona Variável* (VARICOL®) (MAZZOTTI *et al.*, 1997; HEUER *et al.*, 1998; PAIS *et al.*, 1998; LUDEMANN-HOMBOURGER; NICOUD, 2000; TOUMI *et al.*, 2002; SCHRAMM *et al.*, 2003; KIM *et al.*, 2005; GOMES; RODRIGUES, 2012).

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

- Separações cromatográficas satisfatórias dos enantiômeros do verapamil, em testes preliminares realizados no laboratório, utilizando-se colunas quirais analítica e semi-preparativa recheadas com fase estacionária tris (3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose;
- Ausência, na literatura científica, de trabalhos de pesquisa demonstrando o potencial de separação dos enantiômeros do verapamil na fase estacionária quiral mencionada em escala semi-preparativa e em fase normal;
- Forte potencial revelado pelo fármaco no tratamento de diferentes doenças cardiovasculares e, em especial, por ser apontado como agente anti-tumoral;
- Disponibilização das formas enantiomericamente puras do verapamil para a realização de testes *in vivo*, a fim de se estudar a atuação e as propriedades farmacológicas individuais dos seus enantiômeros;
- Possibilidade de agregar valor comercial ao produto através da separação cromatográfica dos enantiômeros.

1.3. Objetivos

O objetivo geral da tese centrou-se no estudo do processo de separação enantiomérica do fármaco verapamil pela técnica de cromatografia líquida de alta eficiência, utilizando coluna recheada com fase estacionária quiral tris (3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose.

Para o objetivo geral ser atingido, foram traçados os seguintes objetivos específicos:

- Realização do *screening* da fase móvel no quesito composição, partindo-se de diferentes combinações de solventes orgânicos;
- Avaliação de uma faixa de comprimento de onda para o sistema de detecção;
- Avaliação da queda de pressão da coluna cromatográfica;
- Caracterização geométrica das colunas cromatográficas quirais a serem utilizadas em termos de porosidades total, do leito e das partículas que as constituem;
- Determinação dos parâmetros cromatográficos de separação e das constantes de equilíbrio de adsorção (constantes de Henry), assim como a obtenção e a avaliação dos parâmetros termodinâmicos e de transferência de massa;
- Determinação e avaliação dos perfis de eluição dos enantiômeros do verapamil em condições de sobrecarga da coluna cromatográfica;
- Determinação das isotermas de adsorção não-linear e de seus respectivos parâmetros;
- Obtenção dos parâmetros operacionais e de desempenho do processo de separação dos enantiômeros do verapamil por cromatografia líquida contínua contracorrente utilizando-se as tecnologias *Leito Móvel Simulado* (LMS) e *Leito Móvel Simulado com Comprimento de Zona Variável* (VARICOL®).

Capítulo 2

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste capítulo será apresentada uma revisão da literatura sobre aspectos que são relevantes para o entendimento do processo de separação enantiomérica em cromatografia líquida e à interpretação de resultados experimentais obtidos em laboratório. Para melhor compreensão do assunto, serão abordados os fundamentos de estereoquímica e uma breve descrição a respeito do fármaco alvo deste trabalho. Posteriormente, será dado um embasamento teórico dos métodos utilizados para a determinação de parâmetros referentes ao processo de separação cromatográfica em pequena e larga escala. Finalizando o capítulo, serão apresentadas as tecnologia de leito móvel em cromatografia líquida contínua contracorrente, enfocando os principais sistemas de separação voltados à produção em larga escala de compostos enantiomericamente puros.

2.1. Fundamentos de estereoquímica

2.1.1. Considerações gerais

O início do estudo e da compreensão dos fenômenos quirais é atribuído, em parte, a Jean-Baptist, Louis Pasteur e van't Hoff / Le Bel que descobriram, durante o século XIX, a capacidade de alguns compostos de desviar a luz plano polarizada, a assimetria molecular destes compostos e a configuração tetraédrica do átomo de carbono (ORLANDO *et al.*, 2007). Consequentemente, estas descobertas marcaram o surgimento da estereoquímica, causando uma importante mudança no campo de estudo relacionado com as estruturas tridimensionais de moléculas. Desde então, a química orgânica, voltada aos estudos da estrutura molecular e propriedades físicas de moléculas de carbono, adquiriu maior destaque dentro do cenário científico (COELHO, 2001).

2.1.2. Estereoquímica

Define-se a estereoquímica como uma ciência da química orgânica que estuda a relação entre a estrutura molecular tridimensional e suas propriedades. Os isômeros (do grego *isômeres* = partes iguais) são compostos diferentes que apresentam forma molecular idêntica, as quais se subdividem em *isômeros estruturais*, cujos átomos encontram-se ligados em ordens diferentes e em *estereoisômeros*, que são estruturas isoméricas que diferenciam entre si unicamente pelo arranjo tridimensional dos seus substituintes (SOLOMONS, 1996).

Os isômeros estruturais são classificados em *isômeros de cadeia*, pertencentes a uma mesma função química com cadeias carbônicas diferentes; *isômeros de posição*, as quais possuem função química e cadeia carbônica idênticas, diferindo apenas pela posição de um grupo funcional, radical ou insaturação; e *isômeros de função*, que como o próprio nome indica, diferem pelo grupo funcional a que pertencem. Por outro lado, os estereoisômeros são divididos em *diastereoisômeros*, cujas moléculas exibem diferentes arranjos espaciais de seus ligantes, porém não são imagens especulares umas das outras; e em *enantiômeros* (do grego *enantio* = oposto), caracterizados por moléculas que são imagens especulares umas das outras e que não se sobrepõem (COELHO, 2001; ROSA, 2005).

A propriedade da *quiralidade* ou *assimetria* é a condição necessária e suficiente para a existência dos enantiômeros. Portanto, as moléculas que não são sobreponíveis às respectivas imagens num espelho plano dizem-se quirais. Todas as moléculas quirais (Figura 1) têm enantiômeros e todas as moléculas opticamente ativas são quirais. Por outro lado, uma molécula que se superpõe à sua imagem especular é dita aquiral, é opticamente inativa e não apresenta enantiômero (ALLINGER *et al.*, 1978; SILVA JUNIOR, 2003).

2.1.3. Enantiômeros

Enantiômeros são compostos de mesma fórmula molecular, que não se sobrepõem, sendo imagem especular do seu par complementar, denominado de antípoda óptico. A diferença entre as moléculas está na maneira como os átomos estão dispostos no espaço e na ordenação nas respectivas moléculas (ROSA, 2005). Portanto, apresentam as mesmas propriedades físicas e

químicas tais como: ponto de fusão, ponto de ebulição, solubilidade, densidade, dentre outras. Muitas destas propriedades dependem das grandezas de forças intermoleculares que agem sobre moléculas e, no caso de moléculas enantioméricas, estas forças são idênticas (ALLINGER *et al.*, 1978; SOLOMONS, 1996). Deste modo, não é possível separar enantiômeros por métodos tradicionais como a destilação e cristalização fracionadas ou cromatografia clássica (SOLOMONS, 1996).

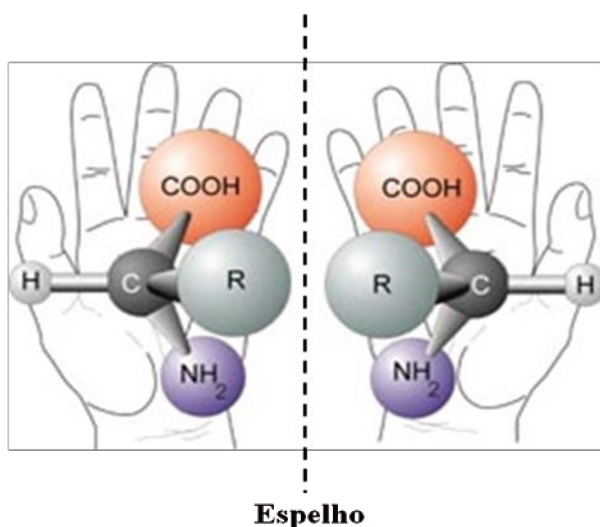


Figura 1. Representação esquemática de moléculas quirais. Observa-se que as moléculas relacionam-se umas com a outras da mesma forma que a mão esquerda se relaciona com mão direita, ou seja, não se superpõem.

De acordo com o arranjo espacial, os enantiômeros recebem, em seus respectivos nomes, os prefixos (*R*) ou (*S*) seguindo o sistema de nomenclatura desenvolvido, em 1966, pelos químicos R.S. Cahn, C.K. Ingold e V. Prelog e adotado pela *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC). As identificações *R* (do latim *rectus* = direita) e *S* (do latim *sinister* = esquerda) são atribuídas com base no número atômico do átomo ligado diretamente ao centro estereogênico da molécula. Logo, o grupo com o menor número atômico tem prioridade mais baixa, o grupo com número atômico imediatamente superior recebe a prioridade seguinte e assim sucessivamente (SOLOMONS, 1996).

Existe também outra nomenclatura atribuída aos enantiômeros e que está relacionada à sua capacidade de desviar a luz plano polarizada. Esta propriedade dos enantiômeros é conhecida como rotação óptica. Se o plano desviar para a esquerda, no sentido anti-horário, a molécula é levógira (latim *laevus* = esquerdo). Se o plano for desviado para a direita, no sentido horário, a molécula é dita dextrógira (latim *dexter* = direito). Por convenção, adotaram-se os sinais negativo e positivo, entre parênteses, para designar os enantiômeros levógiro (*L*) e dextrógiro (*D*), respectivamente (SOLOMONS, 1996; COELHO, 2001). Desta forma, pode-se perceber que as denominações *R-S* e *D-L* são independentes e, portanto, pode-se ter enantiômeros *S*-(+)- ou *S*-(-)- e da mesma maneira o enantiômero *R*-(+)- ou *R*-(-)- (ORLANDO *et al.*, 2007).

A mistura equimolecular de dois enantiômeros é denominada forma racêmica (ou também racemato ou mistura racêmica) (SOLOMONS, 1996). Uma mistura racêmica é opticamente inativa; como tal é freqüentemente designada como ($\pm$). Misturados os dois enantiômeros, a rotação causada pelas moléculas de um dos isômeros é exatamente anulada por uma rotação igual e de sinal contrário, causado por um número igual de moléculas do outro (MORRISON; BOYD, 1992; SILVA JUNIOR, 2003).

2.2. Verapamil

2.2.1. Considerações sobre o fármaco

O verapamil (2-(3,4-dimetoxifenil)-5-[2-(3,4-dimetoxifenil) etil-metil-amino]-2-propan-2-il-pentanonitrila) é um fármaco derivado sinteticamente da papaverina e que exibe potente e seletiva ação bloqueadora sobre os canais de cálcio do tipo L, atuando como agente eficaz no tratamento de doenças cardiovasculares tais como hipertensão, arritmias supraventriculares e angina pectoris (SHIBUKAWA; WAINER, 1992; LANKFORD; BAI, 1995; SAWICKI, 2001; YOSHIDA *et al.*, 2010; SINGHAL *et al.*, 2012). Apresenta fórmula molecular $C_{27}H_{38}N_2O_4$, massa molar de 454,59 g/mol (MATEUS, 2007; NAIA *et al.*, 2008) e encontra-se disponível como líquido oleoso e viscoso de coloração amarelo pálido (NAIA *et al.*, 2008).

O fármaco caracteriza-se por ser um composto quiral comercializado e administrado como mistura racêmica dos enantiômeros *S*-(-)-verapamil e *R*-(+)-verapamil (Figura 2), os quais

exibem propriedades farmacológicas distintas. O enantiômero *S*-(-)-*verapamil* apresenta maior potencial cardiovascular quando comparado ao seu antípoda óptico *R*-(+)-*verapamil* (MATEUS *et al.*, 2007); este, por sua vez, exibe ação antitumoral, atuando como inibidor hepatocarcinogênico (FEDERSEL, 1993; CHAN, 1993; BERMUDEZ; BARRAGAT, 1996; BERNARDI *et al.*, 2003; YOSHIDA *et al.*, 2010).

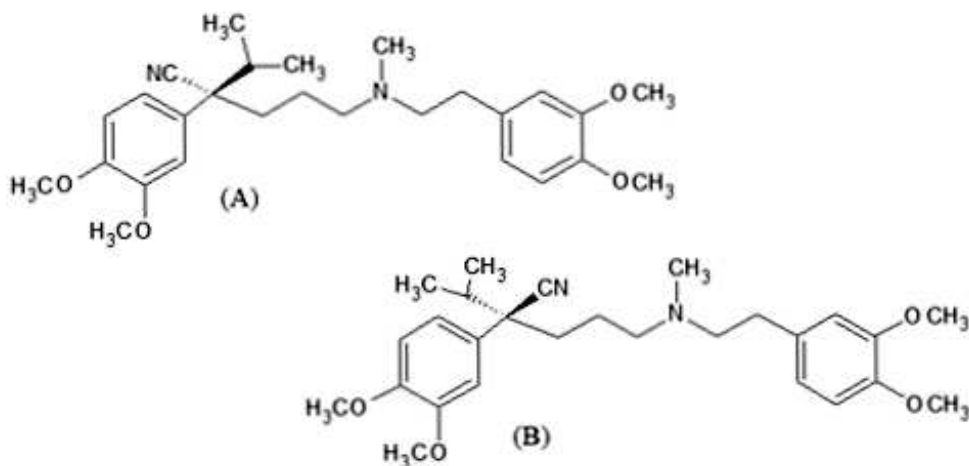


Figura 2. Estrutura molecular dos enantiômeros do verapamil: (A) *S*-(-)-*verapamil*; (B) *R*-(+)-*verapamil*.

2.2.2. Farmacodinâmica: mecanismo de ação

O íon cálcio (Ca^{2+}) é um importante mensageiro intracelular, sendo fundamental nos mecanismos de excitação e contração da musculatura lisa do miocárdio e dos vasos sanguíneos. Além disso, as correntes de cálcio são necessárias para a atividade do nódulo sinusal e do sistema de condução atrioventricular (NAIA *et al.*, 2008).

O íon cálcio penetra no citoplasma celular através de diferentes canais sendo o mais importante, no sistema cardiovascular, os dependentes da voltagem. O mecanismo de ação do verapamil se restringe ao canal do tipo L (canais de grande condutância e com corrente elétrica de longa duração), constituído por várias subunidades, especialmente a α_1 , por ser o local de ligação dos antagonistas dos canais de cálcio (NAIA *et al.*, 2008). Para que o verapamil possa

efetuar sua ação bloqueadora (Figura 3), fixa-se à porção do canal localizado na fase interna da membrana plasmática e, por isso, necessita entrar na célula para exercer seu efeito (BOGGIO, 2008).

No coração, as correntes de cálcio são responsáveis pela despolarização da membrana no tecido de condução e nos miócitos, em associação com as correntes de sódio. Por outro lado, o movimento do cálcio é o principal responsável pela despolarização das membranas dos nós sinusal e atrioventricular. Assim, o bloqueio dos canais L de cálcio a este nível exerce efeitos dromotrópico, inotrópico e cronotrópico negativos (GUIMARÃES *et al.*, 2006; NAIA *et al.*, 2008). Portanto, de maneira geral, o verapamil é responsável pelo bloqueio do influxo de cálcio para os cardiomiócitos, para o tecido nodal e para o músculo liso dos vasos, o que resulta num decréscimo da contração cardíaca (prolonga o tempo de condução) e num relaxamento vascular (BATALIS *et al.*, 2007; NAIA *et al.*, 2008).

2.2.3. Farmacocinética

O fármaco verapamil pode ser administrado via oral ou intravascular em humanos, sendo que mais de 90% da dose, administrada oralmente, torna-se absorvida pelo trato gastrointestinal (NAIA *et al.*, 2008).

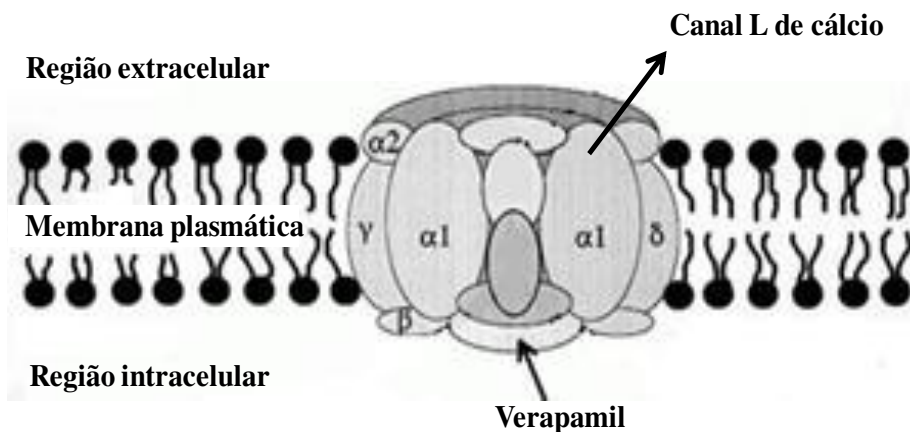


Figura 3. Representação esquemática do local de ligação do verapamil ao canal de cálcio (tipo L). Adaptado de NAIA *et al.*, (2008).

O fármaco passa por um extenso processo de biotransformação, essencialmente por metabolismo hepático, com a formação dos metabólitos *norverapamil*, resultante da N-desmetilação, e *D-617*, resultante da N-desalquilação do verapamil. Esses dois metabólitos iniciais são ainda metabolizados via enzima *CYP* dando origem a três outros metabólitos quirais descritos como *D-620*, *PR-22* e *PR-25*, também conhecido como *D-715* (MATEUS, 2007). A atividade do norverapamil como vasodilatador coronariano representa 20% da atividade do verapamil. Embora menos potente que o verapamil e até mesmo que o norverapamil, o *D-617* diminui a contração cardíaca, enquanto que o *D-620* é capaz de diminuir a condução atrioventricular (SHIBUKAWA; WAINER, 1992; LANKFORD; BAI, 1995; BRANDSTETEROVÁ; WAINER, 1999).

A eliminação do verapamil, como metabólitos, ocorre através da urina, dos quais são excretados 70% da dose administrada por cinco dias, sendo que apenas 3 a 4% é eliminado na forma inalterada. Nas fezes, para o mesmo período, aproximadamente 16% da dose ingerida é excretada como metabólitos (NAIA *et al.*, 2008).

2.3. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

2.3.1. A técnica

A cromatografia caracteriza-se por ser um método físico-químico de separação de componentes de uma mistura, realizada através da distribuição desses componentes em duas fases, que estão em contato íntimo. Uma das fases permanece estacionária, enquanto a outra se move através dela. Durante a passagem da fase móvel sobre a fase estacionária, os componentes da mistura são distribuídos pelas duas fases de tal forma que cada um deles é seletivamente retido pela fase estacionária, o que resulta no transporte diferencial destes componentes (COLLINS *et al.*, 2006).

Dentre os métodos cromatográficos de separação, a CLAE é uma das técnicas mais importantes. Empregando-se colunas recheadas e uma fase móvel, eluída sob altas pressões, torna-se possível realizar separações e análises quantitativas de uma grande variedade de compostos, principalmente de moléculas biologicamente ativas, com rapidez, alta resolução,

eficiência e detectabilidade (SILVA JUNIOR, 2003; ROSA, 2005). Além disso, separações em escala preparativa também são possíveis e relativamente fáceis, o que torna o método um dos mais procurados atualmente (COLLINS *et al.*, 2006).

O conjunto de componentes empregados em CLAE (Figura 4) constitui o chamado *cromatógrafo a líquido*, formado por:

- Reservatório, geralmente de vidro ou aço inoxidável, e sistema de bombeamento da fase móvel, empregando-se comumente bombas do tipo pistão;
- Sistema de introdução da amostra (injetor), constituído por válvula de amostragem do tipo Rheodyne;
- Coluna cromatográfica; responsável pela separação dos componentes da amostra;
- Sistema de detecção, normalmente o UV-VIS, caracterizado pela absorção de luz ultravioleta ou visível, por parte da amostra, quando nela emite-se radiação eletromagnética.
- Controladora, utilizada para controle dos módulos (bomba, detector e, se possível, injetor);
- Micro-computador para registro e tratamento de dados.

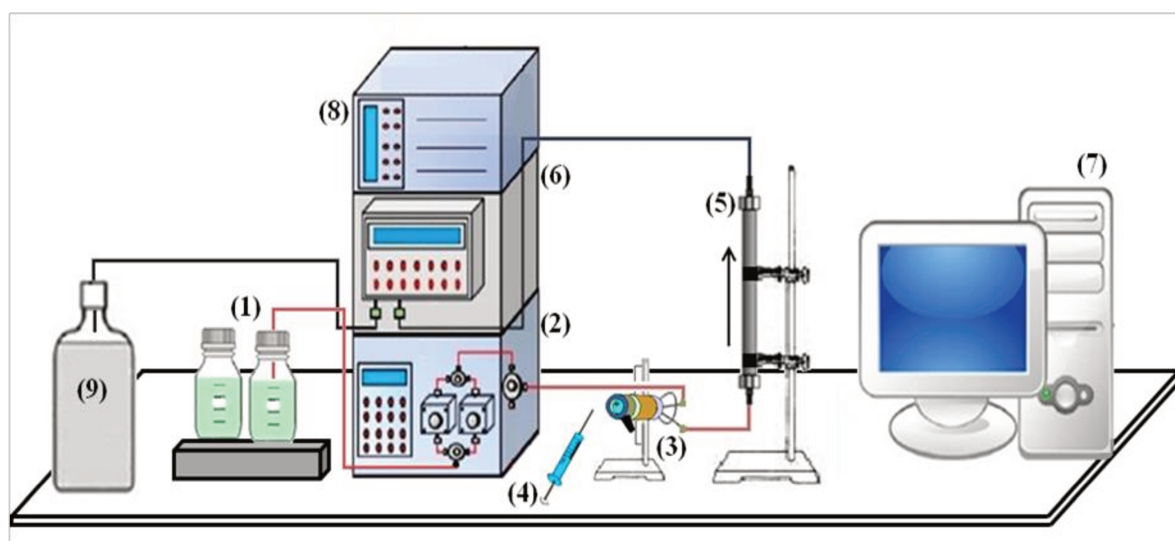


Figura 4. Esquema básico de um equipamento de CLAE: (1) Reservatório de fase móvel; (2) Bomba de fase móvel; (3) Injetor; (4) Seringa de injeção; (5) Coluna cromatográfica; (6) Detector; (7) Sistema de aquisição de dados; (8) Controladora; (9) Frasco de descarte.

Na cromatografia líquida, as espécies que estão sendo separadas ou analisadas sofrem grande influência da fase estacionária e, simultaneamente, as propriedades destas são continuamente influenciadas pela fase móvel (CIOLA, 1998). Por ser de extrema importância nos processos cromatográficos de separação, a fase móvel deve apresentar algumas características físico-químicas relevantes, tais como: baixa viscosidade e ponto de ebulição, elevado grau de pureza, miscibilidade completa de seus componentes; solubilização da amostra e, principalmente não decompor ou dissolver a fase estacionária. Além disso, deve apresentar baixo custo, ser passível de reuso e, preferencialmente, não tóxica (COLLINS *et al.*, 2006).

Para a separação de enantiômeros, especialmente em escala preparativa, a seleção da fase móvel influencia diretamente a produtividade. Parâmetros importantes envolvendo a seletividade de separação, o tempo de retenção, a solubilidade da mistura racêmica e a resolução são sensíveis às mudanças da composição da fase móvel, principalmente quando são utilizadas fases estacionárias quirais baseadas em polissacarídeos (FRANCOTTE, 2001).

2.3.2. Parâmetros cromatográficos de separação

Os parâmetros cromatográficos são indispensáveis para se avaliar e verificar a eficiência de separação de componentes através de colunas, fornecendo informações relevantes do comportamento dos mesmos entre as fases estacionária e móvel. A Figura 5 apresenta um típico cromatograma com os respectivos termos utilizados em cálculos de parâmetros de separação cromatográfica.

Fator de retenção

O *fator de retenção* (k) caracteriza-se por ser uma medida adimensional e de fundamental importância em separações cromatográficas, pois associa a quantidade de moléculas que se encontram retidas na fase estacionária (n_s) com as que percorrem a coluna juntamente com a fase móvel (n_m) (COLLINS *et al.*, 2006). Esse parâmetro cromatográfico também está relacionado à razão dos tempos em que as moléculas permanecem em ambas as fases. Pode ser calculado pela Equação (1), dada por:

$$k = \frac{n_s}{n_m} = \frac{(t_R - t_o)}{t_o} \quad (1)$$

em que (t_R) e (t_o) correspondem aos tempos de retenção dos componentes i ou j e do componente não-retido pela fase estacionária, respectivamente.

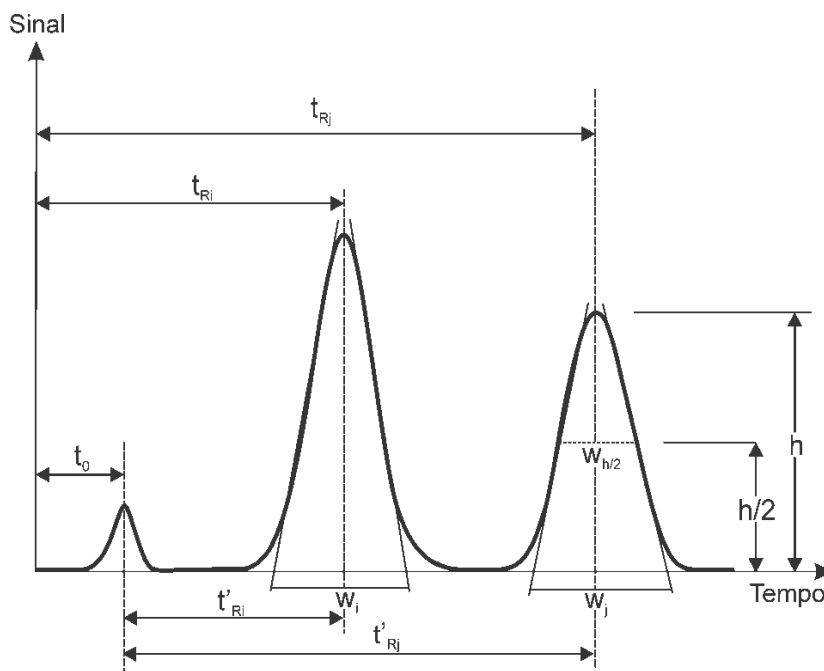


Figura 5. Cromatograma teórico resultante da injeção de uma amostra contendo três componentes distintos. Definição dos termos cromatográficos: (t_o) tempo morto (ou tempo de retardamento) da fase móvel; (w_i, w_j) largura dos picos (entre tangentes); $(w_{h/2})$ largura do pico a meia altura; (t_{Ri}, t_{Rj}) e (t'_{Ri}, t'_{Rj}) tempos de retenção e “retenção corrigido”, respectivamente. Adaptado de COLLINS *et al.*, (2006).

O intervalo ideal para os valores do fator de retenção está compreendido entre 1 e 10 (COLLINS *et al.*, 2006). Valores extremos não são recomendáveis, sejam por fornecerem separações pouco eficientes, devido à baixa interação do componente com a fase estacionária; sejam por implicarem em tempos de análises longos, com alargamento de picos, resultado da

maior afinidade do componente com a fase estacionária. A farmacopéia americana recomenda valores de fator de retenção entre 1 e 8. Dentro dessa faixa, razoáveis interações entre o componente e a fase estacionária são indicadas por valores entre 2 e 4 (ROSA, 2005).

Fator de separação

O *fator de separação* (α) avalia a seletividade da separação para dois picos cromatográficos adjacentes (DIAS, 2007). Este parâmetro pode assumir valores maiores ou iguais a unidade em diferentes temperaturas e dependendo das características da fase móvel e da fase estacionária empregadas (ROSA, 2005). Pode ser definido como uma razão entre os fatores de retenção do componente mais retido (k_j) e do menos retido (k_i) e calculado pela Equação (2).

$$\alpha = \frac{k_j}{k_i} = \frac{t'_{R,j}}{t'_{R,i}} = \frac{t_{R,j} - t_0}{t_{R,i} - t_0} \quad (2)$$

Segundo a farmacopéia americana, parâmetros de seletividade com valores iguais a 1,2 são aceitáveis e caracterizam separações cromatográficas satisfatórias entre os componentes de uma mistura (ROSA, 2005).

Número de pratos

O *número de pratos* (N_p) é um parâmetro utilizado para se avaliar a eficiência de uma coluna cromatográfica. Um prato corresponde a uma etapa de equilíbrio do componente entre as fases estacionária e móvel; portanto, quanto maior o número de pratos, mais equilíbrios ocorrerão, aumentando a eficiência da coluna e, por consequência, a separação (COLLINS *et al.*, 2006). O número de pratos é definido pela Equação (3), descrita como:

$$N_p = 5,545 \cdot \left(\frac{t_R}{w_{h/2}} \right)^2 \quad (3)$$

em que (t_R) e $(w_{h/2})$ representam o tempo de retenção e a largura do pico cromatográfico a meia altura, respectivamente, do componente avaliado.

O valor de N_p mede o alargamento do pico quando o componente, em estudo, passa através da coluna. Quanto mais estreito for o pico cromatográfico obtido, menor será o valor de $(w_{h/2})$ e, conseqüentemente, maior será a eficiência da coluna no processo de separação (ROSA, 2005).

Resolução

A *resolução* (R_s) caracteriza-se por avaliar a qualidade da separação de dois compostos adjacentes, levando-se em consideração a distância que separa os pontos máximos dos picos cromatográficos e a largura a meia altura de suas respectivas bases (COLLINS *et al.*, 2006; DIAS, 2007). O parâmetro é calculado pela Equação (4):

$$R_s = 1,177 \cdot \frac{(t_{Rj} - t_{Ri})}{[(w_{h/2})_i + (w_{h/2})_j]} \quad (4)$$

em que (t_R) e $(w_{h/2})$ correspondem ao tempo de retenção e a largura do pico cromatográfico a meia altura, respectivamente, para os componentes i e j .

Maiores valores de resolução implicam em melhores separações dos componentes. Segundo Collins *et al.*, (2006), valores de resolução iguais a unidade indicam que os picos cromatográficos estão razoavelmente separados; resoluções igual a 1,25 são suficientes para análises quantitativas; e resoluções maiores que 1,5 garantem separação completa (até alcance da linha de base) dos componentes. Por outro lado, a farmacopéia americana considera uma separação completa, sem sobreposição de áreas de picos, para valores de parâmetros de resolução superiores a 2,0 (ROSA, 2005).

É válido ressaltar que a resolução pode ser otimizada, levando-se em consideração os parâmetros relacionados à eficiência, representado pelo número de pratos (N_p), à distribuição dentro da coluna, representada pelo fator de retenção (k), e à seletividade, representada pelo fator

de separação (α). Mudanças nesses três parâmetros acarretam mudanças na resolução e, consequentemente, na separação cromatográfica (COLLINS *et al.*, 2006).

2.3.3. Método dos momentos

A análise dos momentos é uma ferramenta útil para a determinação dos coeficientes de dispersão axial, difusão nos poros (MIYABE; SUZUKI, 1992) e, até mesmo, de propriedades de um leito fixo, como suas porosidades, a partir de experimentos de pulsos cromatográficos. Esse método consiste na análise de concentração do soluto como uma função do tempo na saída do leito fixo em resposta a concentração do soluto no pulso de entrada do leito. Para soluções diluídas, a curva de equilíbrio sólido-líquido pode ser representada por uma reta conforme a Lei de Henry (CREMASCO *et al.*, 2001). A inclinação dessa reta pode ser determinada a partir do primeiro momento de um pulso do soluto, que se associa ao tempo de retenção do mesmo. Parâmetros de transferência de massa podem ser obtidos a partir do segundo momento (SARTOR, 2006).

Por definição dos momentos de uma distribuição, o n -ésimo momento do perfil de banda na saída do leito cromatográfico de comprimento $z = L$ é calculado pela Equação (5) (GUIOCHON *et al.*, 1994)

$$M_n = \int_0^{\infty} c.(t, z = L).t^n dt \quad (5)$$

O n -ésimo momento absoluto ou normalizado é então expresso pela Equação (6):

$$\mu_n = \frac{M_n}{M_0} = \frac{\int_0^{\infty} c.(t, z = L).t^n dt}{\int_0^{\infty} c.(t, z = L).dt} \quad (6)$$

e o n -ésimo momento central é dado pela Equação (7):

$$\bar{\mu}_n = \frac{\int_0^\infty c.(t, z = L).(t - \mu)^n dt}{\int_0^\infty c.(t, z = L).dt} \quad (7)$$

O momento zero de um perfil de concentração de um pico eluente é simplesmente a área do pico. O primeiro momento absoluto (μ_1) está relacionado ao tempo de retenção do pico cromatográfico e então, com a força de ligação, isto é, com a constante de equilíbrio (ARNOLD *et al.*, 1985a; ARNOLD *et al.*, 1985b). O segundo momento central (μ_2) corresponde ao alargamento dos picos, causados pelos efeitos de transferência de massa, podendo estar associado a efeitos de não linearidade das isothermas de adsorção (WANG; CHING, 2002). O parâmetro c nas Equações (5), (6) e (7) corresponde à resposta dos pulsos cromatográficos. Quando o pico cromatográfico apresenta uma forma gaussiana, o segundo momento central torna-se igual à variância σ^2 (ARNOLD *et al.*, 1985a; ARNOLD *et al.*, 1985b).

Portanto as equações do método dos momentos, em termos cromatográficos, podem ser escritas da seguinte forma (RUTHVEN, 1984):

$$\mu_1 = t_R = \frac{L}{u} \left[1 + \left(\frac{1-\varepsilon}{\varepsilon} \right) \cdot \varepsilon_p + \left(\frac{1-\varepsilon}{\varepsilon} \right) \cdot (1-\varepsilon_p) \cdot K_p \right] + \frac{t_{inj}}{2} = \frac{L}{u} \left[1 + \left(\frac{1-\varepsilon}{\varepsilon} \right) \cdot K \right] + \frac{t_{inj}}{2} \quad (8)$$

$$\mu_2 = \sigma^2 = \frac{2L}{u} \left\{ \frac{D_L}{u^2} \left[1 + \left(\frac{\varepsilon}{1-\varepsilon} \right) \frac{1}{K} \right]^2 + \left(\frac{\varepsilon}{1-\varepsilon} \right) \frac{1}{Kk_m} \right\} + \frac{t_{inj}^2}{12} \quad (9)$$

sendo

$$K = \varepsilon_p + (1-\varepsilon_p) \cdot K_p \quad (10)$$

em que u corresponde à velocidade intersticial, L ao comprimento da coluna, ε a porosidade do leito, ε_p a porosidade da partícula, K_p a constante de equilíbrio de adsorção linear

(constante de Henry, H_e) e t_{inj} ao tempo de injeção. D_L e k_m correspondem aos coeficientes de dispersão axial e de transferência de massa global, respectivamente.

2.3.4. Altura equivalente a um prato teórico (*HETP*)

A eficiência de uma coluna cromatográfica é medida em termos do número de pratos (N_p). Um prato, conforme já descrito, corresponde a uma etapa de equilíbrio entre as fases móvel e estacionária; portanto, quanto maior o número de pratos, maior será a eficiência (COLLINS *et al.*, 2006).

Associado ao número de pratos há outro parâmetro, também indispensável à avaliação do desempenho de uma coluna, denominado *altura equivalente a um prato teórico (HETP)*. A partir da obtenção de pequenos valores deste parâmetro, podem-se maximizar N_p e elevar a eficiência da coluna cromatográfica, principais metas desejadas em cromatografia líquida (SILVA JUNIOR, 2003).

A análise da dependência de *HETP* com a velocidade intersticial (u) da fase móvel fornece informações relevantes a respeito do fenômeno de transferência de massa no sistema cromatográfico. Geralmente, são assumidos quatro principais processos do fenômeno em colunas cromatográficas: (i) dispersão axial; (ii) transferência de massa do fluido para a partícula; (iii) difusão intraparticular; e (iv) adsorção/dessorção (MIYABE; GUIOCHON, 1999).

A *altura equivalente a um prato teórico* está relacionada a estes processos que ocorrem durante a eluição cromatográfica de uma amostra. Sua determinação pode ser dada por uma expressão simples, conhecida como equação de van Deemter, mostrada abaixo:

$$HETP = A + \frac{B}{u} + Cu \quad (11)$$

em que *HETP* é a altura equivalente a um prato, u é a velocidade intersticial da fase móvel e A , B e C correspondem aos coeficientes da equação, determinados experimentalmente.

O coeficiente A está relacionado à difusão turbilhonar (Figura 6) e refere-se ao alargamento dos picos cromatográficos devido aos diferentes caminhos tortuosos seguidos pelas

moléculas das amostras. As moléculas que entram ao mesmo tempo na coluna podem ser eluídas em diferentes tempos. Para minimizar este coeficiente, utilizam-se colunas com diâmetro interno pequeno, bem recheadas e partículas uniformes de menores tamanhos (COLLINS *et al.*, 2006).

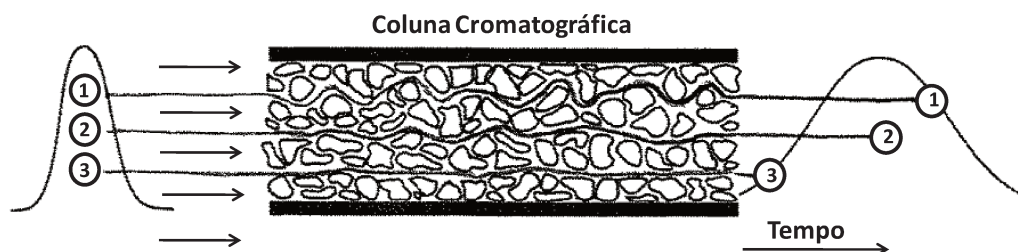


Figura 6. Alargamento do pico cromatográfico a partir de diferentes caminhos seguidos pelas moléculas da amostra. Adaptado de ROSA (2005).

O coeficiente B refere-se à difusão molecular longitudinal (Figura 7), na qual o soluto difunde na fase móvel do centro de maior concentração do pico para regiões mais diluídas na direção do fluxo. O efeito se torna mais pronunciado quando aumenta o tempo de residência do soluto na coluna. Quanto mais alta a vazão da fase móvel, menor o tempo em que o soluto permanece na coluna e ocorre menor alargamento difusivo (ROSA, 2005). O coeficiente B pode ser minimizado trabalhando-se com a viscosidade da fase móvel (COLLINS *et al.*, 2006).

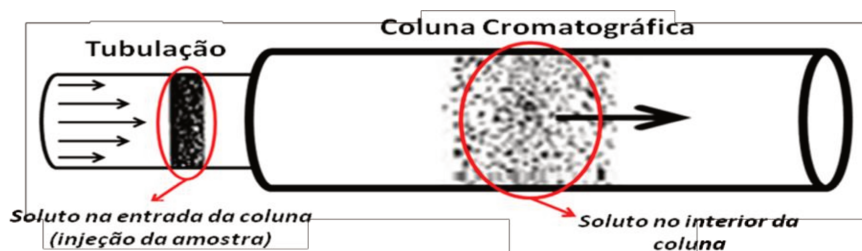


Figura 7. Difusão longitudinal do soluto na fase móvel para as extremidades de concentrações mais baixas. Adaptado de Rosa (2005).

Finalmente, o coeficiente C da Equação (11) representa a transferência de massa do soluto entre a fase móvel que percola o leito e a fase líquida estagnada no interior da estrutura porosa da

partícula sólida (Figura 8) (GRITTI *et al.*, 2007). De uma maneira geral, o termo C provoca aumento da $HETP$ com o aumento da vazão, sendo proporcional ao aumento do quadrado do diâmetro médio da partícula e inversamente proporcional à difusividade molecular (GRITTI *et al.*, 2007). Ressalta-se ainda que, quanto mais viscosa for a fase móvel e maior for o tamanho das partículas que constituem a fase estacionária, mais importante será este fenômeno (ROSA, 2005).

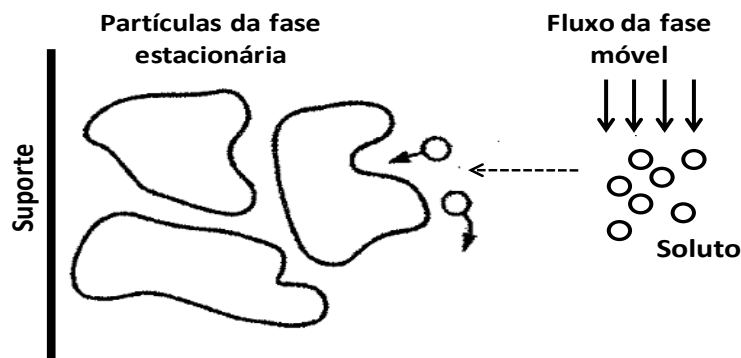


Figura 8. Transferência de massa envolvendo o efeito do tamanho de partícula e viscosidade da fase móvel. Adaptado de ROSA (2005).

A Figura 9 mostra a variação da altura equivalente a um prato teórico ($HETP$) em função da velocidade intersticial (u) da fase móvel. A curva representa, na prática, um modo de selecionar a vazão ótima de uma corrida cromatográfica. Pode-se observar que o primeiro termo (coeficiente A) da Equação (11) é independente da velocidade intersticial; ao passo que os termos (B/u) e ($C.u$) são inversamente e diretamente proporcional a velocidade intersticial da fase móvel, respectivamente.

A curva superior representa o perfil resultante da $HETP$ em função velocidade intersticial (u) e apresenta um valor mínimo para a altura dos pratos ($HETP_{\text{mínimo}}$) a uma dada velocidade intersticial ótima ($u_{\text{ótima}}$). Abaixo da velocidade ótima, $HETP$ é fortemente dependente dos efeitos de difusão molecular (coeficiente B), ao passo que para velocidades elevadas, o termo de transferência de massa (coeficiente C) domina o processo (SEWELL *et al.*, 1988; ROSA, 2005).

Para um sistema com isoterma de adsorção linear, a eficiência da coluna cromatográfica é avaliada pela análise da $HETP$, conforme equação abaixo:

$$HETP = \left(\frac{L}{N_p} \right) = \left(\frac{\sigma^2}{\mu^2} \right) \cdot L \quad (12)$$

em que N_p corresponde ao número de pratos e L ao comprimento da coluna.

As Equações (8) e (9), obtidas através do método da análise dos momentos, podem ser combinadas com a Equação (12), resultando na Equação (13), em que k_m é o coeficiente de transferência de massa global, K corresponde ao termo relativo ao equilíbrio de adsorção, D_L é o coeficiente de dispersão axial e ε refere-se à porosidade do leito (DUAN *et al.*, 1998).

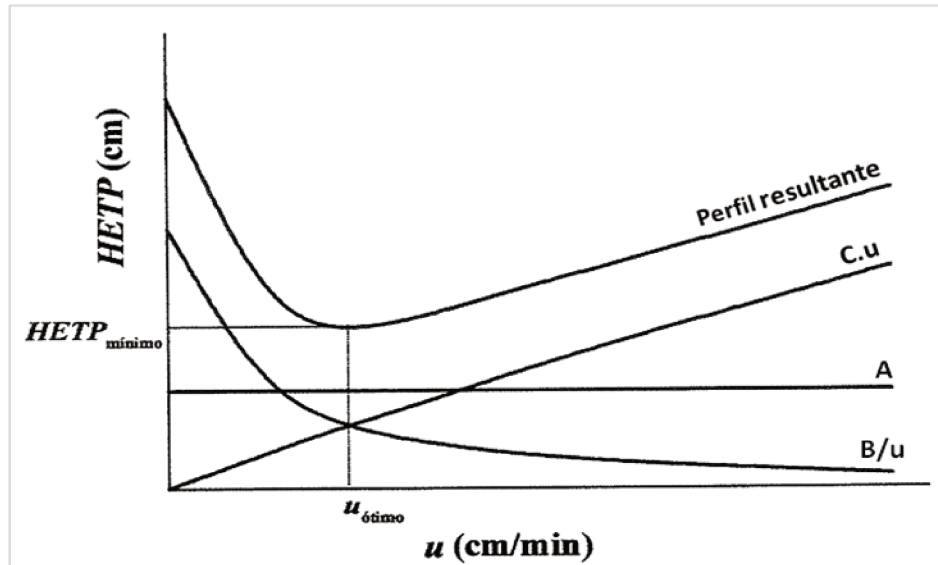


Figura 9. Variação da altura equivalente a um prato teórico ($HETP$) em função da velocidade intersticial (u) da fase móvel de acordo com a equação de van Deemter. Adaptado de COLLINS *et al.*, (2006).

$$HETP = \frac{2D_L}{u} + 2u \left(\frac{\varepsilon}{1-\varepsilon} \right) \frac{1}{Kk_m} \left[1 + \left(\frac{\varepsilon}{1-\varepsilon} \right) \frac{1}{K} \right]^{-2} \quad (13)$$

em que K pode ser calculado pela Equação (10).

Usualmente, é assumido que a dispersão axial resulta dos mecanismos de difusão axial molecular e turbulenta (GUIOCHON *et al.*, 1994). Em uma primeira aproximação, estes efeitos são aditivos e o coeficiente de dispersão pode ser representado por:

$$D_L = \gamma_1 D_m + \gamma_2 d_p u \quad (14)$$

em que D_m corresponde ao coeficiente de difusão molecular, d_p ao diâmetro da partícula e γ_1 e γ_2 são as constantes da equação, cujos valores, normalmente assumidos, são iguais a 0,7 e 0,5, respectivamente (RUTHVEN, 1984).

A contribuição da difusão molecular (primeiro termo da Equação (14)) para o coeficiente de dispersão axial geralmente é desprezível perante o segundo termo. Portanto, a seguinte equação modificada de van Deemter pode ser derivada da Equação (11) (MIYABE; GUIOCHON, 1999).

$$HETP = A + C.u \quad (15)$$

sendo o coeficiente A igual a

$$A = \frac{2.D_L}{u} \quad (16)$$

e o coeficiente C igual a

$$C = 2 \left(\frac{\varepsilon}{1 - \varepsilon} \right) \frac{1}{K k_m} \left[1 + \left(\frac{\varepsilon}{1 - \varepsilon} \right) \frac{1}{K} \right]^{-2} \quad (17)$$

2.4. Cromatografia líquida quiral

2.4.1. Breve relato

A obtenção de enantiômeros puros representa um grande desafio à química moderna devido às propriedades físicas similares que apresentam. A aplicação de métodos tradicionais de separação, como a destilação e a cristalização fracionadas ou mesmo a cromatografia convencional, torna-se impraticável, justamente pelo fato de estas moléculas apresentarem pontos de ebulição, solubilidades e forças de adsorção idênticas, respectivamente. Portanto, a separação de dois enantiômeros de uma mistura racêmica constitui, por consequência, uma tarefa cuja realização exige um método especial (MORRISON; BOYD, 1992).

Os métodos de separação quiral utilizando-se técnicas de cromatografia líquida têm se mostrado muito eficientes na separação de enantiômeros. A literatura aborda dois métodos, indireto e direto, envolvendo a formação de derivados diastereoisoméricos (SILVA JUNIOR *et al.*, 2006).

O método indireto baseia-se na formação prévia de diastereoisômeros pela adição de reagentes ou aditivos quirais opticamente puros, os quais por apresentarem propriedades físico-químicas distintas, podem ser separados recorrendo-se a fases estacionárias aquirais. No entanto, apesar do método dispor, comercialmente, de reagentes para a derivação de vários grupos funcionais, é pouco utilizado atualmente por apresentar maior consumo de tempo atribuído à reação de derivação, exigir reagentes e aditivos quirais de elevado custo, possibilitar a racemização do reagente durante a formação dos diastereoisômeros ou então, necessitar de tratamento químico posterior para a recuperação dos enantiômeros (COLLINS *et al.*, 2006). Portanto, o método direto torna-se o mais atrativo para a separação de misturas enantioméricas por se tratar de um processo simples na determinação de purezas de enantiômeros e ser de fácil extensão para a escala preparativa (CASS *et al.*, 1997; SARTOR, 2006).

O método direto envolve o uso de colunas quirais e fundamenta-se na diferença entre as estabilidades das ligações dos pares diastereoisoméricos, obtidos pelos enantiômeros e uma dada fase estacionária quiral. A diferença de estabilidade entre os complexos diastereoisoméricos transitórios formados entre o seletor quiral e os enantiômeros conduz a diferenças nos tempos de

retenção e, portanto, à separação. A separação, por sua vez, ocorre devido à possibilidade de diferentes forças de interação simultânea, em que pelo menos uma delas deve ser estereoespecífica, podendo ser repulsiva (interações estéricas, por exemplo) ou atrativa (interações dipolo-dipolo, ligações de hidrogênio, etc.) (COLLINS *et al.*, 2006; LOURENÇO *et al.*, 2010). O enantiômero que forma o complexo menos estável elui primeiro (DIAS, 2007). A separação direta de enantiômeros é possível desde que exista reconhecimento quiral entre a mistura racêmica e o seletor quiral. Para que ocorra o reconhecimento quiral, segundo o modelo de “interação de três pontos”, proposto por Dagliesh em 1952, são necessárias três interações simultâneas entre um dos enantiômeros e o seletor quiral, sendo que, pelo menos uma dessas interações seja estereoquimicamente dependente. Além disso, as interações devem ser de sítios distintos tanto no enantiômero quanto no seletor quiral. O outro enantiômero interage somente com dois sítios do seletor quiral (LOURENÇO *et al.*, 2010).

Apesar das colunas quirais apresentarem elevado custo e o mecanismo de separação quiral ainda ser de difícil entendimento, as vantagens apresentadas pelo método direto se sobrepõem (COLLINS *et al.*, 2006; CASS *et al.*, 1997). O método pode ser aplicado à separação de uma larga variedade de compostos racêmicos, possibilitando a obtenção de ambos os enantiômeros isolados com elevado grau de pureza óptica; além disso, apresenta facilidade de operacionalização e possibilita separar enantiômeros de misturas racêmicas com características especiais, tais como compostos de difícil derivatização (hidrocarbonetos, por exemplo), facilmente racemizáveis ou que apresentam algum tipo incomum de quiralidade (SILVA JUNIOR *et al.*, 2006).

2.4.2. Fases estacionárias quirais (FEQ)

Nas últimas décadas, o número de fases estacionárias quirais (FEQs) disponíveis para a separação de enantiômeros tem crescido consideravelmente (ANDERSSON; ALLENMARK, 2002; ROSA, 2005). No entanto, não existe uma fase estacionária quiral universal capaz de solucionar todos os problemas de separação, mas sim, diversas fases com diferentes princípios de separação (COLLINS *et al.*, 2006). Dependendo do reconhecimento quiral que exibem durante o processo de separação, podem ser classificadas como: *fases protéicas*, *fases com cavidades*

quirais, fases do tipo Pirkle, fases por troca de ligante e fases baseada em polissacarídeos (SILVA JUNIOR, 2003; COLLINS *et al.*, 2006).

Fases protéicas

Muitos dos compostos quirais naturais envolvendo proteínas, peptídeos e aminoácidos são capazes de interagir enantiosseletivamente com moléculas quirais, o que possibilitou o desenvolvimento de uma grande quantidade de FEQs a partir da imobilização de moléculas protéicas em suporte de sílica. A literatura relata FEQs desenvolvidas a partir da imobilização de soro de albumina bovina (SAB) ou humana (SAH), glicoproteínas ácidas (α_1 -AGP) e ovomucóides (OVM), as quais exibiram elevado reconhecimento quiral para compostos ácidos e básicos (FRANCOTTE, 1994).

Esta classe de FEQs normalmente opera sob condições de fase reversa e as separações dos enantiômeros são conduzidas por interações eletrostáticas e hidrofóbicas, fatores estéricos, ligações de hidrogênio e interações de transferência de carga (COLLINS *et al.*, 2006). A presença de diferentes tipos de sítios de interação altamente estereosseletivos torna a FEQ protéica muito versátil, porém, sua capacidade de carga é baixa devido ao número limitado destes sítios de ligação (FRANCOTTE, 1994). É válido ressaltar que pequenas variações na composição da fase móvel podem causar alterações reversíveis nas moléculas protéicas o que, conseqüentemente, acabam causando ativação e desativação das regiões de interação e influenciando as características da enantioseparação (COLLINS *et al.*, 2006).

As fases protéicas são de elevado custo e de manuseio delicado. Além disso, devido a sua baixa capacidade de carga, são inviáveis em processos de separação quiral que envolvam escala preparativa (SILVA JUNIOR, 2003).

Fases com cavidades quirais

Fases estacionárias do tipo cavidade quiral possuem mecanismo de reconhecimento quiral baseado na complexação de inclusão estereoespecífica de uma molécula do soluto em uma

molécula de cavidade orientada, relativamente grande, que é ligada à fase estacionária (SILVA JUNIOR, 2003).

Nesta classe, tem-se como destaque as ciclodextrinas (CD) como seletoras quirais. As ciclodextrinas são moléculas cíclicas de oligossacarídeos quirais de origem natural, com forma similar à de um cone truncado, consistindo de seis, sete e oito unidades de glicose, as quais são denominadas de α , β e γ -CD, respectivamente e que são comercialmente disponíveis (BONATO; JABOR, 2005). O diâmetro e o volume da cavidade variam com o número de unidades de glicose no anel da CD. O tamanho da cavidade e o substituinte nas ciclodextrinas são determinantes na capacidade de complexação da molécula quiral desejada (FRANCOTTE, 1994). Sua cavidade interna é relativamente hidrofóbica, enquanto que as bordas da cavidade são hidrofílicas, devido à presença de grupos hidroxilas primários e secundários.

Para que ocorra o reconhecimento quiral, pelo menos uma parte da molécula hóspede deverá entrar adequadamente na cavidade da CD. O complexo de inclusão formado pode ser estabilizado por interações secundárias específicas entre a parte da molécula do soluto que ficou para fora da cavidade e os grupos hidroxilas ou outros grupos funcionais da borda da CD, principalmente por interações como ligações de hidrogênio. Outras interações incluem as interações hidrofóbicas, dipolo-dipolo e de transferência de carga (BONATO; JABOR, 2005).

A β -ciclodextrina (β -CD) (Figura 10) é a estrutura mais aplicada, visto que seu arranjo cíclico eleva as cavidades quirais nas quais moléculas de diferentes estruturas podem ser complexadas (CABRERA; LUBDA, 1994; SILVA JUNIOR, 2003). As fases estacionárias quirais baseadas em ciclodextrinas são preparadas pela imobilização das mesmas em estruturas poliméricas ou em sílica gel. Estas fases estacionárias mostraram bom desempenho em separações analíticas e preparativas. As aplicações preparativas foram implantadas em polímeros obtidos por ligações cruzadas de ciclodextrinas com bis(epoxipropil) etilenoglicol e nos materiais de sílica modificada Cyclobond I e ChiraDex (FRANCOTTE, 1994).

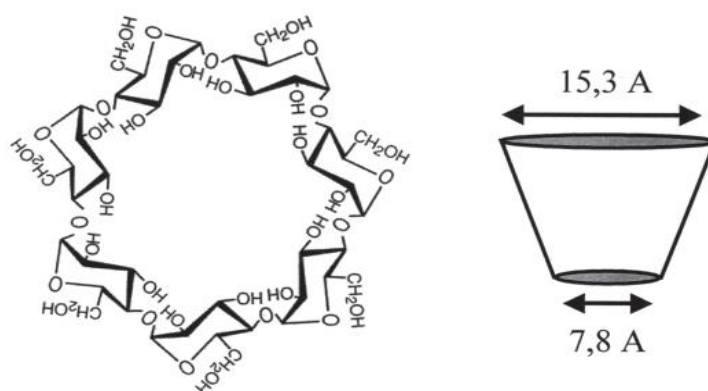


Figura 10. Estrutura química das β -ciclodextrinas. (BONATO; JABOR, 2005).

Fases do tipo “PIRKLE”

As fases do tipo “Pirkle” são preparadas a partir de moléculas quirais sintéticas, geralmente aminoácidos modificados, covalentemente ligadas à superfície do suporte (LOURENÇO *et al.*, 2010). Os seletos quirais empregados nesta fase possuem unidades aromáticas que desempenham papel fundamental na formação dos complexos diastereoisoméricos entre a fase estacionária e os enantiômeros da mistura racêmica. Além da interação π - π , estas FEQ também podem interagir através de ligações de hidrogênio, interação dipolo-dipolo e estérica (ALI *et al.*, 2006).

Esta classe de fase estacionária pode ser dividida em três tipos, diferenciada pelas unidades aromáticas presentes em sua estrutura química: as π -ácidas (com grupos aceptores de elétrons), adequadas para separar enantiômeros contendo grupos doadores de elétrons π ; as π -básicas (com grupos doadores de elétrons), que discriminam compostos que possuem grupos receptores de elétrons π ; e as π ácido-base, úteis na resolução quiral de compostos com grupos aceptores e/ou doadores de elétrons π (WELCH, 1995). Estas diferentes FEQs são utilizadas no modo normal de eluição, apesar de apresentarem poder de discriminação quiral no modo reverso (LOURENÇO *et al.*, 2010).

As fases π -ácidas foram empregadas na separação de compostos aromáticos, ácidos arilpropíonicos e arilsuccinamidas (FELIX; BERTHOD, 2007). Neste tipo de fase aceptora de elétrons, destaca-se a fase 3,5-dinitrobenzoilfenilglicina (Figura 11a) caracterizada pela eficiente

separação de diversas classes de compostos quirais, tais como sulfóxidos, aminas, aminoácidos, lactonas, hidroxiácidos e mercaptanas (LOURENÇO *et al.*, 2010). Com relação às fases π -básicas, estas exibem enantiosseparação para alcoóis, aminoácidos e aminas (FELIX; BERTHOD, 2007). Um exemplo de FEQ doadora de elétrons é a derivada de naftilalanina (Figura 11b) constituída por um anel naftaleno em sua estrutura química (WELCH, 1995).

Uma das fases mais eficientes é a Whelk-O[®] 1 (Regis Technologies), caracterizada como π ácido-básico (Figura 11c) (PIRKLE; WELCH, 1984). Essa FEQ mostrou excelente enantiosseletividade na separação de misturas racêmicas de derivados cetônicos, alcoóis, flavonas, epóxidos e sulfóxidos (CLEVELAND, 1995).

É válido ressaltar que todas estas fases apresentadas são comercialmente disponíveis tanto para separações analíticas quanto para separações preparativas de enantiômeros (FRANCOTTE, 1994).

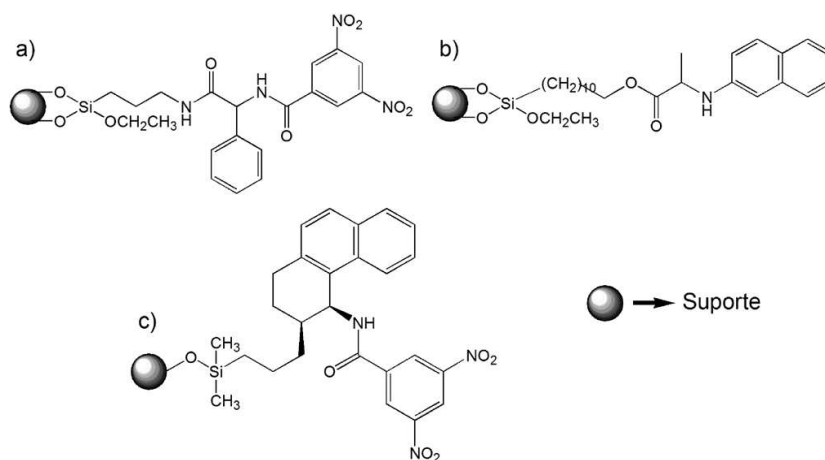


Figura 11. Estruturas químicas das fases estacionárias do tipo “Pirkle”. a) 3,5-dinitrobenzoilfenilglicina, b) naftilalanina e c) (S,S) Whelk-O[®]1. (Lourenço *et al.*, 2010).

Fases por troca de ligantes

O princípio básico da cromatografia de troca de ligantes é a coordenação reversível de solutos quelantes com um íon metálico que está complexado com um seletor quiral, formando complexos ternários seletor quiral/ íon metálico/ soluto quiral (Figura 12) (SILVA JUNIOR,

2003; LOURENÇO *et al.*, 2010) Estes complexos diastereoisoméricos são estabilizados por interações dipolo-dipolo, estéricas e ligações de hidrogênio (LOURENÇO *et al.*, 2010).

Esta classe de FEQ torna-se útil para a resolução quiral de solutos que apresentam dois ou três grupos funcionais doadores de elétrons (hidroxila, amino e carboxílicos), tais como aminoácidos, peptídeos, aminoalcoóis e hidroxiácidos. Os íons metálicos preferencialmente escolhidos são Cu^{2+} e Ni^{2+} e os seletos quirais incluem aminoácidos cíclicos como prolina e hidroxiprolina, aminoácidos contendo enxofre derivados da cistina e penicilina (SILVA JUNIOR, 2003; LOURENÇO *et al.*, 2010).

Embora as fases do tipo troca de ligantes estejam presentes no mercado, desenvolvidas e comercializadas por grandes empresas do ramo, tais como a Daicel Chemical Industries e Phenomenex, as mesmas apresentam aplicações restritas quando comparadas às demais fases estacionárias quirais, visto que conseguem separar um número limitado de compostos quirais (KURGANOV *et al.*, 1994).

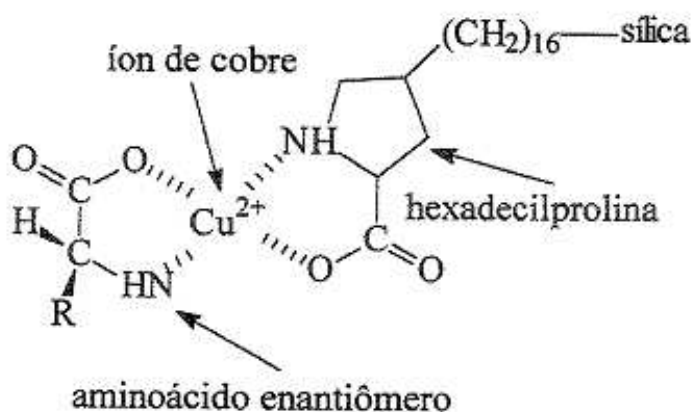


Figura 12. Complexação ternária estereosseletiva (SILVA JUNIOR, 2003).

2.4.3. Fases estacionárias polissacarídicas

2.4.3.1. Considerações gerais

Dentre as inúmeras fases estacionárias aplicadas para a separação de compostos opticamente ativos, as fases baseadas em polissacarídeos alcançaram grande repercussão na área

da resolução quiral, justamente por exibirem maiores seletividade, sensibilidade e reprodutibilidade (ALI; ABOUL-ENEIN, 2007). A aplicação de polissacarídeos em separações quirais tornou-se assunto de vários trabalhos científicos de revisão (CHANKVETADZE, 2003; NISHI, 2003; ABOUL-ENEIN; ALI, 2003; YAMAMOTO; OKAMOTO, 2003). Zhang *et al.*, (2005) reportou que as fases estacionárias polissacarídicas são responsáveis pela separação quiral de mais de 95% de racematos utilizando-se técnicas cromatográficas.

Esta classe de fases estacionárias pode ser preparada por métodos de recobrimento, voltados à adsorção dos seletores quirais em suportes adequados, geralmente em sílica-gel (ALI; ABOUL-ENEIN, 2007) ou por métodos de imobilização, caracterizados pela presença de ligação covalente direta do seletor quiral ao suporte ou pela reticulação do polissacarídeo, previamente imobilizado em suporte, por ligações intercruzadas. Alguns métodos de imobilização combinam ambas as estratégias (LOURENÇO *et al.*, 2010). Neste método, antes de se iniciar o procedimento de imobilização, faz-se necessário definir, teoricamente, os sítios de ligação entre a FEQ e o suporte de sílica-gel (ALI; ABOUL-ENEIN, 2007).

Apesar das FEQs imobilizadas apresentarem maior estabilidade e ser aplicadas a uma ampla faixa de solventes, a enantiosseletividade que apresentam, em geral, é menor perante as FEQs preparadas por recobrimento, conforme reportado por diversos trabalhos científicos disponíveis na literatura (OKAMOTO *et al.*, 1987; YASHIMA *et al.*, 1994; OLIVEROS *et al.*, 1995; OLIVEIROS *et al.*, 1998; KUBOTA *et al.*, 2001). A causa provável deve-se à ligeira mudança ou deterioração das configurações estereoespecíficas destas fases que ocorrem durante o procedimento de imobilização. Normalmente, as FEQs imobilizadas são quimicamente ligadas à sílica-gel através de grupos hidroxí dos polissacarídeos, o que pode provocar alterações estruturais e configuracionais destes polímeros, resultando na diminuição da capacidade de reconhecimento quiral (ALI; ABOUL-ENEIN, 2007).

Portanto, na maioria das FEQs disponíveis comercialmente e aplicadas em separações quirais, os derivados de polissacarídeos encontram-se recobrindo as partículas de sílica usadas como suportes. Se por um lado, têm-se ganhos na enantiosseletividade, por outro, limita-se a seleção dos componentes da fase móvel a alguns solventes compatíveis, nos quais os derivados não são solúveis (BONATO; JABOR, 2005).

Atualmente, encontram-se disponíveis no mercado mundial, mais de 20 fases estacionárias derivadas de polissacarídeos como a celulose e a amilose, desenvolvidas pelo método de recobrimento (ALI; ABOUL-ENEIN, 2007). Importantes empresas do ramo de separações quirais, tais como a Daicel Chemical Industries[®], Phenomenex[®] e, mais recentemente, a Kromasil[®] comercializam colunas cromatográficas quirais recheadas com tais fases estacionárias.

2.4.3.2. Breve relato sobre a fase estacionária

Os polissacarídeos *in natura* são capazes de discriminar enantiômeros e resolver misturas racêmicas. Entretanto, as suas habilidades de reconhecimento quiral não são suficientes para aplicação como FEQ em cromatografia líquida (OKAMOTO *et al.*, 1984). Por outro lado, são facilmente convertidos a uma variedade de derivados, criando novos sítios para o reconhecimento quiral (BONATO; JABOR, 2005; LOURENÇO *et al.*, 2010).

O primeiro derivado de polissacarídeo largamente utilizado, desenvolvido por Hesse e Hagel em 1973 foi o triacetato de celulose (CTA-I), preparado por acetilação da celulose microcristalina em benzeno (HESSE; HAGEL, 1973). Esta fase quiral apresentou boa habilidade de separação enantiosseletiva e foi usada para a separação de muitos compostos alifáticos e aromáticos (BRASCHKE, 1986; FRANCOTTE, 1994). Posteriormente, Okamoto e colaboradores (OKAMOTO *et al.*, 1984), desenvolveram outro tipo de fase estacionária, adsorvendo triacetato de celulose em partículas de sílica macroporosa, cuja capacidade de reconhecimento quiral apresentou-se completamente distinta da fase desenvolvida por Hesse e Hagel, sendo observada a inversão na ordem de eluição de enantiômeros (ICHIDA *et al.*, 1984).

Desde então, inúmeras outras fases foram preparadas pelo grupo de Okamoto, baseadas em tris-benzoatos, tris-fenilcarbamatos e tris-benzilcarbamatos de polissacarídeos adsorvidos em partículas de sílica macroporosa (geralmente modificadas com grupos aminopropil). O suporte de sílica proporcionou a resistência mecânica necessária para a obtenção de colunas mais eficientes e estáveis perante as modificações na composição da fase móvel (BONATO; JABOR, 2005). Algumas dessas FEQs são disponíveis comercialmente, como apresentado na Tabela 1. Esta

evolução é atribuída principalmente à necessidade de se obter formas enantioméricas opticamente puras de compostos quirais biologicamente ativos (FRANCOTTE, 1994).

Uma variedade de polissacarídeos tais como dextrana, inulina, quitosana, quitina e xilana foram eficientemente derivados e usados como seletos quirais para a separação de diferentes classes de compostos quirais. Contudo, as fases estacionárias derivadas de amilose e celulose apresentaram os melhores resultados devido à configuração favorável as quais estes polímeros exibem frente à enantioseparação (ALI; ABOUL-ENEIN, 2007). Estudos de mecanismo de discriminação quiral, ancorados em dados cromatográficos, espectroscópicos (ressonância magnética nuclear e espectrometria de massas) e cálculos computacionais sugerem que os derivados de celulose e amilose apresentam uma estrutura de “calha” helicoidal com os grupos carbamatos e benzoatos localizados em seu interior e os grupos aromáticos hidrofóbicos localizados mais externamente. A resolução quiral depende do ajuste dos enantiômeros nesta “calha” do polissacarídeo e da interação com os grupos carbamatos e benzoatos (BONATO; JABOR, 2005).

Tabela 1. Fases estacionárias baseadas em polissacarídeos mais utilizadas para separações nas escalas semi-preparativa e preparativa

<i>FASE ESTACIONÁRIA</i>	<i>NOME COMERCIAL</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	Chiralpak [®] AD
Tris[(S)-feniletilcarbamato] de amilose	Chiralpak [®] AS

Fonte: Adaptado de (SILVA JUNIOR, 2003).

Dentre as FEQs baseadas em fenilcarbamatos, as fases tris-(3,5-dimetilfenilcarbamato) de celulose e amilose (Figura 13) (OKAMOTO *et al.*, 1984; YASHIMA; OKAMOTO, 1995; OKAMOTO; IKAI, 2008) são as mais estudadas e utilizadas devido à elevada estabilidade e a

grande capacidade de discriminação e resolução de uma ampla variedade de compostos quirais que apresentam (LOURENÇO *et al.* 2010).

Nestes derivados, os enantiômeros podem interagir através de ligações de hidrogênio com os grupos $-(NH)$ e $-(C=O)$ da fase estacionária, além de interações dipolo-dipolo com os grupos $-(C=O)$. Yashima *et al.*, (1994) concluiu que os grupos $-(NH)$ e $-(C=O)$ são os sítios de ligações mais importantes destas fases estacionárias. Interações $\pi-\pi$ do grupo fenil da fase estacionária com grupos aromáticos de racematos também podem ocorrer (BONATO; JABOR, 2005; ALI; ABOUL-ENEIN, 2007; LOURENÇO *et al.*, 2010). Ali e Aboul-Enein (2002) observaram que as interações do tipo $\pi-\pi$ são forças de ligação importantes para a resolução quiral de racematos aromáticos. A capacidade de enantioseparação nos derivados tris-fenilcarbamatoss é fortemente influenciada pela posição e natureza dos substituintes, tais como metil, etil, halogênios ou NO_2 , nos grupos fenila. Geralmente, a introdução de um grupo doador (metil) ou aceptor (halogênios) de elétrons nas posições 3 e 4 melhora a resolução de muitos racematos (BONATO; JABOR, 2005).

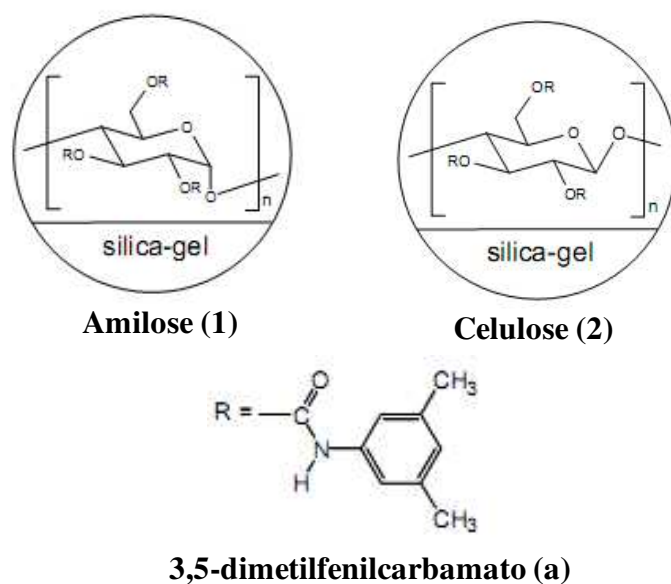


Figura 13. Fases estacionárias derivadas de fenilcarbamatoss de amilose e celulose: **(1a)** *tris*(3,5-dimetilfenilcarbamatoss) de amilose e **(2a)** *tris*(3,5-dimetilfenilcarbamatoss) de celulose.

Embora as FEQs de polissacarídeos apresentem grande aplicabilidade na resolução de misturas enantioméricas com várias estruturas químicas, alguns solventes cromatográficos como o tetrahidrofurano (THF), acetato de etila, acetona, clorofórmio, dimetilsulfóxido (DMSO), diclorometano e tolueno não podem ser usados como fases móveis, uma vez que podem solubilizar o seletor quiral adsorvido na sílica (LOURENÇO *et al.*, 2010).

2.5. Isotermas de adsorção

2.5.1. Considerações gerais

As isotermas de adsorção descrevem quantitativamente a distribuição de equilíbrio de um soluto entre as fases estacionária e móvel envolvidas no processo cromatográfico sob uma ampla faixa de concentração (JACOBSON *et al.*, 1984; LIM *et al.*, 1995). São consideradas como ferramentas fundamentais voltadas à modelagem de processos de separação em cromatografia líquida (SEIDEL-MORGENSTERN; GUIOCHON, 1993).

Sob condições de sobrecarga, as isotermas de adsorção apresentam comportamento não-linear. O desvio da linearidade deve-se a várias razões, principalmente relacionadas à saturação ou heterogeneidade da superfície ou às interações soluto-soluto na camada líquida e/ou próxima à superfície do adsorvente (JAMES *et al.*, 1999). Em cromatografia linear, efeitos de dispersão axial e os processos de transferência de massa são os principais responsáveis pelo grande alargamento dos picos cromatográficos, ao passo que, em cromatografia preparativa, estes efeitos são menos importantes. Assim, o conhecimento da isoterma frequentemente contribui para explicar o mecanismo de retenção e pode ajudar a propor rotas visando melhorar a separação, predizer a taxa de produção e, até mesmo, a extensão da purificação. Logo, são de interesse particular para separações enantioméricas (MIHLBACHLER *et al.*, 2002) e tem atraído, de fato, considerável atenção da indústria farmacêutica (JAMES *et al.*, 1999).

Diversos métodos experimentais para a determinação de isotermas de adsorção para um único componente ou para multicomponentes (isotermas competitivas) são reportadas na literatura (SEIDEL-MORGENSTERN, 2004). Esses métodos podem ser classificados em *estáticos*, que utilizam informações no estado de equilíbrio e não analisam a curva

concentração-tempo; e *dinâmicos*, baseados em análise matemática da curva resposta que correspondem às mudanças bem definidas das concentrações na entrada da coluna cromatográfica ao longo do tempo (SEIDEL-MORGENSTERN, 2004).

Devido à lentidão, incertezas para se alcançar o equilíbrio e a grande quantidade de soluto e adsorvente requerida para medidas precisas, os métodos estáticos são pouco utilizados (JACOBSON *et al.*, 1984). Então, ao longo dos últimos 50 anos, foram desenvolvidos diversos métodos dinâmicos, dedicados à cromatografia, visando maior eficiência e precisão para medidas de isothermas (JAMES *et al.*, 1999). Dentre estes métodos estão incluídos a *Análise Frontal* (AF), *Análise Frontal por Pontos Característicos* (AFPC), *Eluição por Pontos Característicos* (EPC) e *Métodos de Perturbação* (MP).

Através de comparações experimentais e revisões reportadas na literatura (LAUB; PECSOK, 1978; CONDER; YOUNG, 1979; GUIOCHON *et al.*, 1994) observou-se que os métodos AF, EPC e AFPC são os mais convencionais para a determinação de isothermas de adsorção. Contudo, os métodos EPC e AFPC são utilizados apenas para a determinação de isothermas monocomponente, ao passo que, o método AF pode ser aplicado para a determinação de isothermas mono e multicomponentes, sendo, portanto, o método mais utilizado para obtenção de dados de equilíbrio de adsorção competitiva (JACOBSON *et al.*, 1987; GUIOCHON *et al.*, 1994; FELINGER *et al.*, 2003; ZHOU *et al.*, 2003).

2.5.2. Método da análise frontal (AF)

Entre os vários métodos cromatográficos disponíveis para se determinar isothermas de adsorção, a análise frontal é o mais comumente utilizado pela sua acurácia e relativa simplicidade (MIHLBACHLER *et al.*, 2002).

No método, a solução contendo uma concentração conhecida da mistura em estudo é continuamente alimentada na coluna até que se atinja a saturação completa. Ao se atingir o estado de saturação (condição de equilíbrio), uma nova solução de concentração mais elevada e conhecida é alimentada na coluna até que uma nova condição de equilíbrio seja alcançada. Esse procedimento é repetido sucessivas vezes gerando sucessivas curvas de ruptura; cada curva

corresponde a um ponto experimental na isoterma de adsorção competitiva (JACOBSON *et al.*, 1987; GUIOCHON *et al.*, 1994; SILVA JUNIOR, 2006).

Para misturas binárias, a curva de ruptura possui duas ondas separadas por um platô intermediário na etapa de adsorção (Figura 14), cuja largura diminui com o aumento da concentração de ambos os componentes na fase móvel (BURGER *et al.*, 2000; SUN *et al.*, 2001). Se a condição inicial para a curva de ruptura é que a coluna esteja em equilíbrio com a fase móvel, apenas o enantiômero menos retido é eluído durante este platô intermediário. Geralmente, a concentração do soluto menos retido no platô intermediário é maior que a sua concentração na alimentação. Na etapa de dessorção da curva de ruptura, também pode ser possível a observação de um platô característico intermediário correspondente ao enantiômero mais retido (MIHLBACHLER *et al.*, 2002; SILVA JUNIOR, 2006).

Os dados experimentais da isoterma de adsorção podem ser determinados através de balanços de massa, representado pela Equação (18) (MIHLBACHLER *et al.*, 2002; JACOBSON *et al.*, 1987).

$$q_i = \frac{(t_2 - t_0)(C_{b,i} - C_{a,i}) - (t_2 - t_1)(C_{p,i} - C_{a,i})}{V_{ads}} \quad (18)$$

em que q_i corresponde a concentração do soluto i na fase estacionária; t_0 , ao tempo morto do sistema e t_1 e t_2 aos tempos de retenção da primeira e segunda frentes de adsorção, respectivamente; V_{ads} representa o volume de adsorvente presente na coluna; $C_{a,i}$ corresponde à concentração do soluto i na alimentação da coluna; $C_{b,i}$ corresponde à concentração do soluto i no platô superior (posterior à segunda frente de adsorção); e $C_{p,i}$ refere-se à concentração do soluto i no platô intermediário.

A determinação dos pontos da isoterma de adsorção pode, também, ser realizada seguindo os princípios do método de análise frontal na região posterior da curva de ruptura, seguindo a Equação (19) (MIHLBACHLER *et al.*, 2002; SARTOR, 2006)

$$q_i = \frac{(t_3 - t_0)(C_{b,i} - C_{a,i}) + (t_3 - t_4)(C_{p,i} - C_{a,i})}{V_{ads}} \quad (19)$$

em que, agora, t_3 e t_4 são os tempos de retenção da primeira e da segunda frente de dessorção, respectivamente.

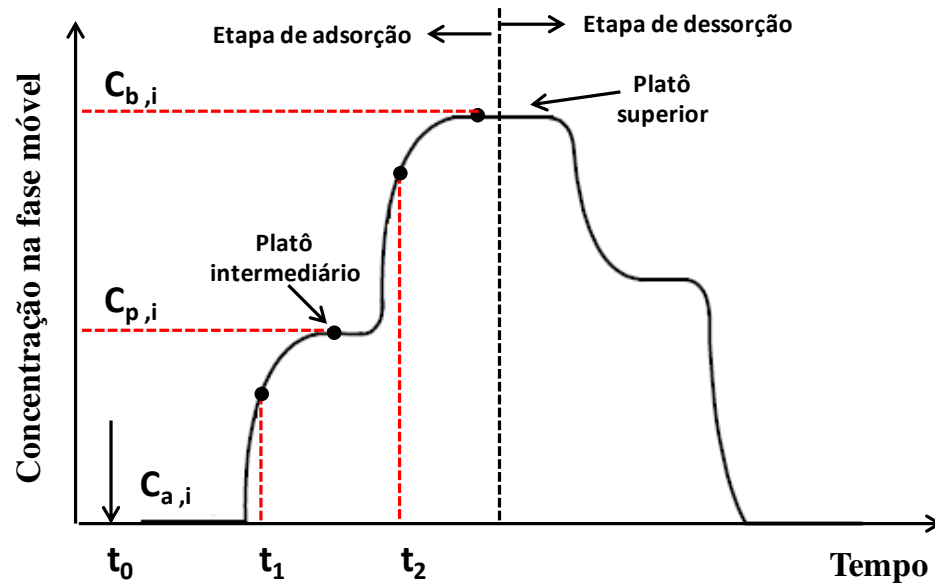


Figura 14. Curva de ruptura para uma mistura binária: indicações dos tempos de retenção das frentes de adsorção e das concentrações durante eluição para uma concentração de alimentação conhecida. Adaptado de SARTOR (2006).

2.5.3. Modelos de isotermas de adsorção

Modelo Linear

Para baixas concentrações dos solutos presentes na fase móvel, o equilíbrio de adsorção pode ser representado por uma relação linear entre as concentrações nas fases estacionária e móvel, através da expressão (SARTOR, 2006):

$$q_i = H e_i C_i \quad (20)$$

em que q_i é a concentração do soluto i adsorvido na fase sólida; C_i a concentração do soluto i na fase líquida; e He_i refere-se à constante de Henry.

Modelo de Langmuir Competitivo

O modelo de *Langmuir competitivo* (1916) considera que o processo de adsorção ocorre na superfície composta por um número fixo de sítios ativos de adsorção de igual energia, a qual apenas uma única molécula pode ser adsorvida por sítio até que seja alcançada a cobertura da monocamada (JAMES *et al.*, 1999). O modelo baseia-se nas premissas de que a superfície do adsorvente é homogênea e que as moléculas adsorvidas não interajam entre si (DO, 1998). A equação que o descreve é dada por:

$$q_i = q_s \frac{b_i C_i}{1 + b_A C_A + b_B C_B} = \frac{He_i C_i}{1 + b_A C_A + b_B C_B}; \quad i = A, B \quad (21)$$

em que q_i corresponde à concentração do soluto i adsorvido na fase sólida; q_s refere-se a capacidade de saturação da monocamada do adsorvente; e b_i representa a constante de equilíbrio de adsorção. A constante de Henry (He) para o soluto i é igual ao produto ($q_s \cdot b_i$). Os solutos são representados pelos subscritos A e B .

O modelo é freqüentemente aplicado nos estudos de equilíbrio sólido-líquido não-linear, embora seja muito simples para descrever o processo de adsorção em fases estacionárias quirais (FELINGER *et al.*, 2003; GRITTI; GUIOCHON, 2003). Sua grande vantagem reside no pequeno número de parâmetros requeridos e na simplicidade de sua dedução (CAVAZZINI *et al.*, 2002).

Modelo Bi-Langmuir Competitivo

A isoterma do tipo *Bi-Langmuir competitiva* torna-se apropriada para descrever o mecanismo de retenção misto em separações quirais (ZHOU *et al.*, 2003; FELINGER *et al.*, 2003). O modelo assume que a superfície do adsorvente é recoberta por dois diferentes tipos de

sítios ativos: os não-seletivos, os quais retêm ambos os enantiômeros com a mesma energia de adsorção; e os enantiosseletivos, que interagem diferentemente com estes dois enantiômeros, ligando-se a eles com diferentes energias e, portanto, responsáveis pela separação quiral (ZHANG *et al.*, 2006).

Embora os sítios não-seletivos contribuam para a retenção de ambos os enantiômeros, estes não apresentam seletividade para um ou outro componente. Logo, a capacidade de saturação e a constante de equilíbrio são idênticas para o par enantiomérico. Com relação aos sítios seletivos quirais, enquanto a capacidade de saturação frequentemente apresenta-se igual ou muito próxima para ambos os enantiômeros, as constantes de equilíbrio diferem significativamente (GUIOCHON *et al.*, 1994; ZHOU *et al.*, 2003; FELINGER *et al.*, 2003).

A equação que descreve a isoterma *Bi-Langmuir* para o comportamento competitivo de dois enantiômeros pode ser expressa como (ZHANG *et al.*, 2006):

$$q_i = \frac{q_{ns} b_{ns,i} C_i}{1 + b_{ns,i} (C_A + C_B)} + \frac{q_s b_{s,i} C_i}{1 + b_{s,A} C_A + b_{s,B} C_B}; \quad i = A, B \quad (22)$$

em que q_i é a concentração do soluto i adsorvido na fase estacionária; $b_{ns,i}$ é a constante de equilíbrio de adsorção do soluto i nos sítios não-seletivos; $b_{s,i}$ é a constante de equilíbrio de adsorção do soluto i nos sítios enantiosseletivos; q_{ns} representa a capacidade de saturação dos sítios não-seletivos; e q_s a capacidade de saturação dos sítios enantiosseletivos do adsorvente. Os subscritos A e B correspondem aos enantiômeros (solutos) menos e mais retidos, respectivamente.

Modelo de Langmuir Competitivo Modificado

Este modelo, representado pela Equação (23), é um caso particular do *modelo de Langmuir competitivo* e tem se mostrado adequado para descrever a adsorção em fases estacionárias quirais (SILVA JUNIOR, 2006). Na equação, h refere-se ao parâmetro linear, q_s à capacidade de saturação da monocamada do adsorvente (fase estacionária) e b_i à constante de equilíbrio de adsorção (ZHANG *et al.*, 2003; RODRIGUES *et al.*, 1995). A adsorvidade (γ_i) é

dada pelo produto ($q_s.b_i$), enquanto que a constante de Henry (He) pode ser definida como a soma dos parâmetros h e γ_i , (MAZZOTTI *et al.*, 1997).

$$q_i = h_i C_i + q_s \frac{b_i C_i}{1 + b_A C_A + b_B C_B}; \quad i = A, B \quad (23)$$

Vale ressaltar que o termo linear da equação está relacionado com os sítios não-seletivos da fase estacionária quiral, ao passo que o termo não-linear compreende aos sítios de adsorção enantiosseletivos (NICOUD; SEIDEL-MORGENSTERN, 1996).

2.5.4. Análise termodinâmica de adsorção

Como descrito anteriormente, a separação direta de enantiômeros, por cromatografia líquida, deve-se à formação de complexos diastereoisoméricos transitórios, obtidos a partir de interações intermoleculares com o seletor quiral da fase estacionária. O processo de formação, para os enantiômeros R e S , pode ser caracterizado por parâmetros termodinâmicos (LEHOTAY *et al.*, 2004).

As variações na energia livre de Gibbs (ΔG), durante a transferência do soluto entre as fases móvel e estacionária, podem ser expressas pela Equação (24).

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S = -RT \ln \left(\frac{k}{\varphi} \right) \quad (24)$$

em que k é o fator de retenção do soluto, φ é a proporção de fases na coluna (razão entre os volumes de fase estacionária e fase móvel), R é a constante universal dos gases ideais, e T a temperatura absoluta. ΔH e ΔS referem-se à variação de entalpia e entropia, respectivamente.

Expressando a energia livre de Gibbs de acordo com as mudanças nos parâmetros termodinâmicos entalpia e entropia, o fator de retenção passa a depender da temperatura, conforme descrito pela Equação (25).

$$\ln k = -\frac{\Delta H}{RT} + \frac{\Delta S}{R} + \ln \varphi \quad (25)$$

Aplicando-se o método de *van't Hoff*, uma correlação linear pode ser obtida, fazendo-se um gráfico da variação de $\ln k$ em função de $(1/T)$, cuja inclinação e interseção da reta fornecem os valores de $(\Delta H / R)$ e $[(\Delta S / R) + \ln \varphi]$, respectivamente. O comportamento linear será obedecido desde que não haja alterações de conformação da fase estacionária (ROSA, 2005). Gráficos não-lineares são obtidos para fases estacionárias que apresentam superfícies heterogêneas ou que sofram mudanças devido à temperatura (DIAS, 2007).

Os valores negativos de ΔH indicam que os enantiômeros encontram-se na fase estacionária quiral, por ser uma condição energeticamente favorável; ao passo que, valores negativos de ΔS indicam um aumento na desordem do sistema cromatográfico (fase estacionária/ fase móvel/ enantiômeros) com os enantiômeros sendo transferidos para a fase estacionária quiral (SILVA Jr. *et al.*, 2009).

Maiores informações sobre o processo de discriminação quiral podem ainda ser obtidas através de análises dos parâmetros de Gibbs-Helmholtz [$\Delta(\Delta H)$ e $\Delta(\Delta S)$], visto que separações cromatográficas quirais são determinadas pela diferença de energia livre de adsorção $\Delta\Delta G$ dos enantiômeros (SILVA Jr. *et al.*, 2009). As diferenças entre as energias livres podem ser calculadas levando-se em consideração o fator de separação (α), a partir da Equação (26).

$$\ln \alpha = -\frac{\Delta(\Delta G)}{RT} = -\frac{\Delta(\Delta H)}{RT} + \frac{\Delta(\Delta S)}{R} \quad (26)$$

Na Equação (26), os termos $\Delta(\Delta G)$, $\Delta(\Delta H)$ e $\Delta(\Delta S)$ representam as diferenças de ΔG , ΔH e ΔS para um dado par de enantiômeros, respectivamente. Vale ressaltar ainda que o termo $\Delta(\Delta G)$ é responsável pela maior retenção do segundo enantiômero na fase estacionária quiral (BERTHOD *et al.*, 2004).

Em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), a enantioseparação é mais influenciada, na maioria dos casos, pelo termo entálpico (ΔH), isto porque os experimentos são geralmente realizados a temperaturas relativamente baixas. A interação dos enantiômeros com o

sistema cromatográfico conduz a valores negativos de $\Delta(\Delta H)$ e $\Delta(\Delta S)$, indicando, de fato, que há transferência do soluto da fase móvel para a fase estacionária (SILVA Jr. *et al.*, 2009). Como esses parâmetros termodinâmicos são acessíveis, são freqüentemente usados para prover informações do sistema de separação. Se a dependência de $\ln(\alpha)$ em função de $(1/T)$ é linear com inclinação igual a $\Delta(\Delta H)/R$ e para $\ln(k)$ o intercepto é $\Delta(\Delta S)/R$, então se pode assumir que: (i) as variações de entalpia (ΔH) e entropia (ΔS) são independentes da temperatura; os enantiômeros interagem com o seletor quiral através de mecanismo associativo simples; e o equilíbrio de solvatação-dessolvatação não encobre o processo de associação de enantiômeros com a fase estacionária quiral (ROSA, 2005).

Como citado acima, a enantiosseletividade, expressa por $\Delta(\Delta G)$, é principalmente influenciada por $\Delta(\Delta H)$ a baixas temperaturas. Com o aumento da temperatura, o termo entálpico será mais compensado pelo termo $T\Delta(\Delta S)$. Para uma dada temperatura tem-se que $\Delta(\Delta G)$ é nulo e os enantiômeros não são separados ($\alpha = 1$). Essa temperatura é definida como temperatura de isoenantiosseletividade (T_{iso}) e pode ser determinada pela Equação (27).

$$T_{iso} = \frac{\Delta(\Delta H)}{\Delta(\Delta S)} \quad (27)$$

Acima da temperatura de isoenantiosseletividade, a ordem de eluição dos enantiômeros pode ser alterada e a enantiosseletividade é predominantemente influenciada pelo termo entrópico (LEHOTAY *et al.*, 2004). Entretanto, para a maioria dos enantiômeros, a T_{iso} é muito maior que a faixa de temperatura de trabalho. Portanto, o sistema é controlado por efeitos entálpicos e a ordem de eluição dos enantiômeros é mantida (SILVA Jr. *et al.*, 2009).

2.6. Sobrecarga da coluna cromatográfica

Em cromatografia analítica, a coluna cromatográfica é operada com soluções muito diluídas. Dessa forma, os parâmetros cromatográficos de adsorção geralmente se encontram dentro da região linear das isothermas e são independentes da massa injetada, sendo os perfis de concentração simétricos e Gaussianos (SCHMIDT-TRAUB, 2005). Quando há um aumento na

concentração a um volume de injeção constante ou quando há um aumento na massa injetada com variação no volume de injeção, os perfis de concentração mudam. Essa situação é denominada de *sobrecarga na coluna* e é caracterizada pelo decréscimo nos coeficientes de retenção dos solutos, um decréscimo no número de pratos ou aumento na altura equivalente a um prato e uma perda de resolução cromatográfica. Do ponto de vista da engenharia, sistemas operando em sobrecarga são não-lineares, devido a não-linearidade das isotermas de adsorção, bem como à dispersão e aos efeitos de transferência de massa. Do ponto de vista de química analítica, a sobrecarga da coluna é considerada, por convenção, quando a massa da amostra por unidade de massa da fase estacionária causa um decréscimo de 10% no fator de retenção ou um decréscimo de 50% no número de pratos (SILVA Jr. *et al.*, 2009).

Em outras palavras, a sobrecarga é caracterizada por uma perda de resolução, aumento na assimetria (efeito de cauda nos cromatogramas) e redução nos tempos de retenção, devido ao aumento da não-linearidade do equilíbrio de adsorção, isto é, a isoterma de adsorção possui um desvio da linearidade, deixando de obedecer a lei de Henry (SILVA Jr. *et al.*, 2009).

Para a otimização da taxa de separação de uma determinada substância em uma coluna semi-preparativa ou preparativa, é necessário o conhecimento das condições de sobrecarga da coluna cromatográfica. Em colunas analíticas, o volume de injeção não deve ultrapassar o valor de 1% do volume da coluna. Porém, em escala preparativa, essa limitação não ocorre devido a elevada taxa de separação requerida para essas colunas (ROSA, 2005).

Uma coluna cromatográfica pode atingir a condição de sobrecarga quando a amostra é pouco solúvel na fase móvel ou o volume de injeção é elevado para as dimensões da coluna e quando se injeta alta concentração da amostra na coluna (ROSA, 2005; DIAS, 2007).

Quando a sobrecarga na coluna é considerada, dois procedimentos podem ser descritos. O primeiro, *sobrecarga de concentração*, considera o soluto muito solúvel na fase móvel e é realizado com volume de injeção constante de soluções com concentrações crescentes. Com o aumento da concentração da solução injetada, espera-se que os picos cromatográficos sejam distorcidos, podendo ocorrer o aumento da cauda. O segundo tipo de sobrecarga, *sobrecarga de volume*, considera o soluto com solubilidade baixa ou até intermediária na fase móvel. Partindo-se de uma solução concentrada, preparada para a faixa de solubilidade do soluto na fase móvel, volumes crescentes da mesma solução são injetados no sistema cromatográfico. O aumento do

volume de injeção, dentre outros fatores, como a força do sorvente usado para a diluição, pode resultar na deformação do pico. Os picos cromatográficos tendem a forma simétrica e a partir de um certo volume de injeção sua altura pode manter-se constante (MACHERY-NAGEL, 2000).

2.7. Modelagem matemática da coluna cromatográfica quiral

O comportamento de um sistema cromatográfico é governado por três fenômenos básicos (SCHMIDT-TRAUB, 2005; SCHULTE *et al.*, 1997):

- a *termodinâmica de adsorção*, descrita pelas isotermas de adsorção, as quais fornecem a concentração do soluto na fase móvel, quando o equilíbrio é atingido, a uma dada temperatura;
- a *hidrodinâmica da coluna cromatográfica*, isto é, as propriedades do escoamento através do meio poroso, que podem ser descritas por uma relação entre vazão e pressão;
- a *transferência de massa*, em que os diferentes mecanismos do fenômeno podem contribuir para o alargamento dos picos cromatográficos reduzindo assim a eficiência de separação.

O balanço de massa diferencial do componente i ($i = 1,2$) na coluna j é escrito da seguinte forma, segundo o *modelo do equilíbrio dispersivo*:

$$\varepsilon_T \frac{\partial C_{i,j}}{\partial t} + (1 - \varepsilon_T) \frac{\partial q_{i,j}}{\partial t} + u_j \frac{\partial C_{i,j}}{\partial z} = \varepsilon_T D_L \frac{\partial^2 C_{i,j}}{\partial z^2} \quad (28)$$

em que $C_{i,j}$ e $q_{i,j}$ são as concentrações do componente i nas fases líquida e sólida na coluna j , respectivamente; ε_T é a porosidade total do leito; e D_L corresponde ao coeficiente de dispersão axial (HAAG *et al.*, 2001).

Para escrever as equações deste modelo, assume-se que (DUAN, 1998):

- o processo no leito fixo para multicomponentes é isotérmico;
- a fase móvel é uma solução diluída;
- a vazão da fase móvel é constante;

- o leito é recheado com partículas de adsorvente porosas, esféricas e de tamanho uniforme;
- o gradiente de concentração na direção radial do leito é desprezível;
- o coeficiente de dispersão axial é constante.

O modelo da *força motriz linear* (FML) do sólido é utilizado para representar o coeficiente de transferência de massa global (k_m) através da coluna:

$$\frac{\partial q_{i,j}}{\partial t} = k_m (q_{i,j}^* - q_{i,j}) \quad (29)$$

em que $q_{i,j}^*$ é a concentração do componente i em equilíbrio com $C_{i,j}$ (GUICHON; LIN, 2003; HAAG *et al.*, 2001).

As condições iniciais e de contorno, na entrada de cada coluna, correspondem às condições de Danckwerts, descritas como:

$$C_i(z, t = 0) = q_i(z, t = 0) = 0 \quad (30)$$

$$\left[u_j C_{i,j} - D_L \frac{\partial C_{i,j}}{\partial z} \right]_{z=0} = u_j C_{i,j}^0 \quad (31)$$

$$\left. \frac{\partial C_{i,j}}{\partial z} \right|_{z=L} = 0 \quad (32)$$

As condições de Danckwerts relatam que o fluxo de massa no ponto de injeção, $u_j C_{i,j}(0, t) - D_L \left(\frac{\partial C_{i,j}}{\partial z} \right)_{z=0}$ é igual ao fluxo de injeção na coluna equivalente, $u_j C_{i,j}^0(t)$. Essas condições são recomendadas quando a eficiência da coluna cromatográfica é baixa, situação típica encontrada em cálculos numéricos realizados para a separação em unidades de leito móvel simulado (GUICHON; LIN, 2003).

2.8. Princípios básicos da tecnologia de leito móvel

Nos últimos anos, a cromatografia preparativa tem aumentado sua importância como um processo de separação, purificação e recuperação nas indústrias farmacêutica, agroquímica e de alimentos, em que as técnicas clássicas como a destilação e evaporação não são possíveis. Muitas aplicações envolvem a cromatografia preparativa em batelada; contudo, notáveis inovações foram alcançadas graças ao desenvolvimento da cromatografia contínua em larga escala, cujas vantagens são significativas em termos de desempenho do processo (GIOVANNI, 2000; SATOR, 2006).

A cromatografia preparativa, enfocada na tecnologia do leito móvel, caracteriza-se, atualmente, como uma das mais importantes técnicas de separação quiral aplicada nas áreas de biotecnologia, farmacêutica e química fina (COX, 2005). O crescente interesse por esta técnica está associado à maior produtividade, ao menor custo de operação e à possibilidade em se obter produtos mais concentrados em tempos relativamente curtos quando comparada à cromatografia em batelada (FRANCOTTE *et al.*, 1998; SHULTE; STRUBE, 2001). Mesmo para separações em escala de produção, em que o baixo custo de operação supera o alto custo fixo, o custo global de separação de uma unidade de leito móvel torna-se menor perante a cromatografia convencional (ZHANG *et al.*, 2004).

A idéia básica de um sistema de leito móvel é promover um contato contracorrente entre as fases sólida (fase estacionária) e líquida (fase móvel), de modo que a transferência de massa, envolvida no processo, possa ser maximizada. Assim, pode-se obter alta produtividade, baixo consumo de solvente e um aumento no desempenho da separação, gerando, consequentemente, uma elevada recuperação do produto com elevado grau de pureza, mesmo quando a seletividade é próxima da unidade ou a eficiência da fase estacionária é baixa (TACHIBANA; OHNISHI, 2001; WANG; WENSLOW, 2003).

Diante deste contexto, serão abordados nessa seção dois sistemas de leito móvel para a cromatografia em escala preparativa: *Leito Móvel Simulado* (LMS) e *Leito Móvel Simulado com Comprimento de Zona Variável* (VARICOL®). Porém, para um melhor entendimento do princípio de funcionamento destes sistemas, tem-se como referência um processo equivalente

denominado *Leito Móvel Verdadeiro* (LMV) (COX, 2005; SARTOR, 2006; SILVA JUNIOR *et al.*, 2006).

Na operação do LMV ideal (Figura 15), os fluxos de líquido e sólido estão em direções opostas e são continuamente reciclados, ou seja, o líquido que deixa a seção 4 é reciclado para a seção 1, enquanto que o sólido saindo da seção 1 é reciclado para a seção 4. A alimentação é injetada entre as seções 2 e 3 e duas linhas de produtos podem ser continuamente coletadas: o extrato, rico no componente mais retido e, então, preferencialmente transportado com a fase estacionária (fase sólida); e o refinado, contendo o componente menos retido que se move justamente com a fase móvel (fase líquida). Com relação ao eluente puro, este é injetado continuamente no início da seção 1 com o líquido reciclado do final da seção 4.

Devido à entrada e saída de quatro correntes (eluente, extrato, alimentação e refinado), a unidade LMV está dividida em quatro seções (ou zonas): seção 1, que se inicia na entrada do eluente e termina no ponto de retirada do extrato; seção 2, iniciada após o ponto de retirada do extrato e finalizada antes da entrada da alimentação; seção 3, que se inicia com a entrada da alimentação e termina no ponto de retirada do refinado; e, por fim, a seção 4, que se estende desde o ponto de retirada do refinado até o ponto de entrada do eluente.

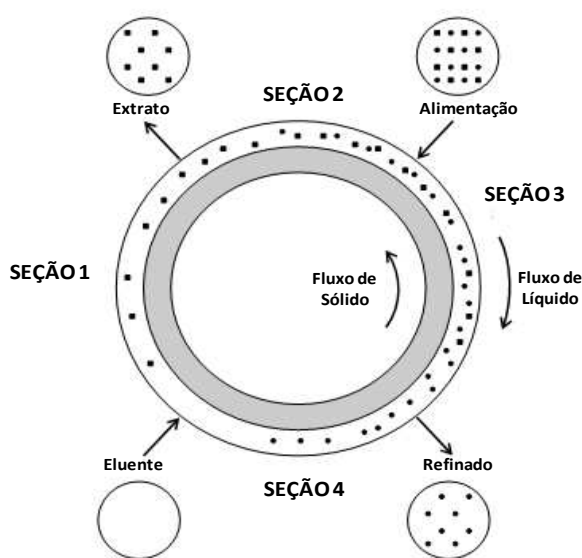


Figura 15. Diagrama esquemático de operação do sistema leito móvel verdadeiro (LMV). (●) Composto menos retido – refinado; (■) Composto mais retido – extrato. Adaptado de COX (2005).

Durante a operação do LMV, a vazão de sólido é constante em toda a unidade. Contudo, devido aos pontos de injeção e coleta, a vazão de líquido difere de seção para seção, e estas, por sua vez, apresentam diferentes funções. A Figura 16 ilustra as respectivas funções de cada seção.

Nas seções 2 e 3, os dois componentes (A e B) movem-se em direções opostas. O componente menos retido (A) deve ser dessorvido e transportado com a fase líquida (fase móvel), ao passo que o componente mais retido (B) deve ser adsorvido e transportado com a fase sólida (fase estacionária). Considerando que nestas zonas o objetivo é evitar a contaminação das correntes de extrato e refinado, então pode-se dizer que as seções 2 e 3 correspondem às zonas de dessorção de A e adsorção de B, respectivamente. Na seção 4, ambos os componentes devem ser adsorvidos a fim de se regenerar o eluente que será reciclado para a primeira zona. Como o componente A é a espécie menos retida, as condições para a adsorção deste componente também possibilita a de espécies mais retidas. Por outro lado, a seção 1 caracteriza-se como a zona de regeneração do sólido, cujos componentes A e B podem ser dessorvidos a fim de se obter uma fase estacionária livre dessas espécies. Sendo o componente B a espécie mais retida, sua condição de dessorção permite também dessorver A (COX, 2005).

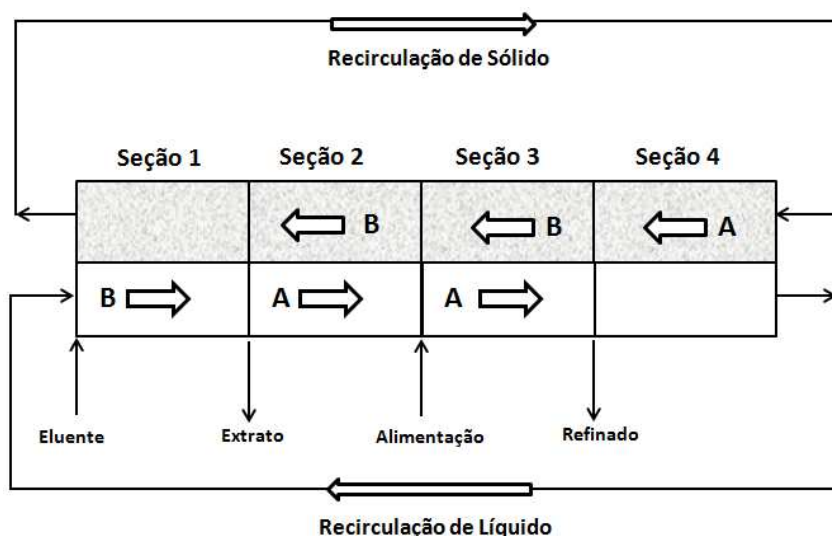


Figura 16. Esquema das quatro seções de uma unidade de Leito Móvel Verdadeiro (LMV) em uma separação binária. (A) composto menos retido; (B) composto mais retido. Adaptado de COX (2005).

Pode-se perceber que o movimento da fase sólida adsorvente faz-se necessário, e isto não pode ser realizado na prática sem considerável redução de eficiência do processo (SARTOR, 2006). A movimentação do sólido leva à erosão mecânica das partículas e a problemas de atrito, assim como o desgaste do sistema de separação (SILVA *et al.*, 2004; GOMES; RODRIGUES, 2012). Portanto, para vencer estes obstáculos, lança-se mão do Leito Móvel Simulado (LMS), desenvolvido justamente para manter as vantagens do processo contínuo contracorrente sem introduzir os problemas associados ao movimento da fase sólida (RODRIGUES; PAIS, 2004).

O LMS consiste no arranjo de várias colunas de leito fixo (Figura 17) em que o processo contracorrente entre as fases sólida e líquida é simulado por mudanças periódicas das posições de entrada e saída na direção do fluxo da fase líquida. Desta forma, a fase sólida não se move e perfis de concentração são alcançados no interior de cada coluna. Tão logo os pontos de alimentação e retirada seguem estes perfis, pode-se gerar um estado estacionário cíclico em que a migração das frentes de adsorção se repete a cada tempo de troca da mesma forma (GIOVANNI, 2000; GOMES; RODRIGUES, 2012).

Na Figura 17 está esquematizado um sistema cromatográfico contínuo com 12 colunas, cuja configuração é 3-3-3-3, isto é, 3 colunas por seção. Porém, esta configuração pode variar para cada sistema e apresentar não necessariamente o mesmo número de colunas por seção (MAZZOTTI *et al.*, 1997).

O conceito da tecnologia do LMS é conhecido desde 1961, quando a primeira patente foi depositada pela UOP (Universal Oil Products, Illinois, Estados Unidos). O surgimento do LMS superou as inconveniências da cromatografia líquida convencional em batelada e proporcionou a aplicação industrial das técnicas cromatográficas.

Exemplos de estudos recentes incluem a separação de enantiômeros (MINCEVA *et al.*, 2003; WANG; CHING, 2004; SANTOS *et al.*, 2004; RAJENDRAN *et al.*, 2005; VEREDAS *et al.*, 2006), processamento de açúcares (MALLMANN *et al.*, 1998; AZEVEDO; RODRIGUES, 2001; BUBNIK *et al.*, 2004), purificação de aminoácidos e proteínas (XIE *et al.*, 2000; CREMASCO; WANG, 2003; MOLNÁR *et al.*, 2004; MOLNÁR *et al.*, 2005), separação de ácidos orgânicos (LEE *et al.*, 2004) e separação de isômeros ópticos derivados de petróleo (SILVA *et al.*, 2004; KURUP *et al.*, 2005).

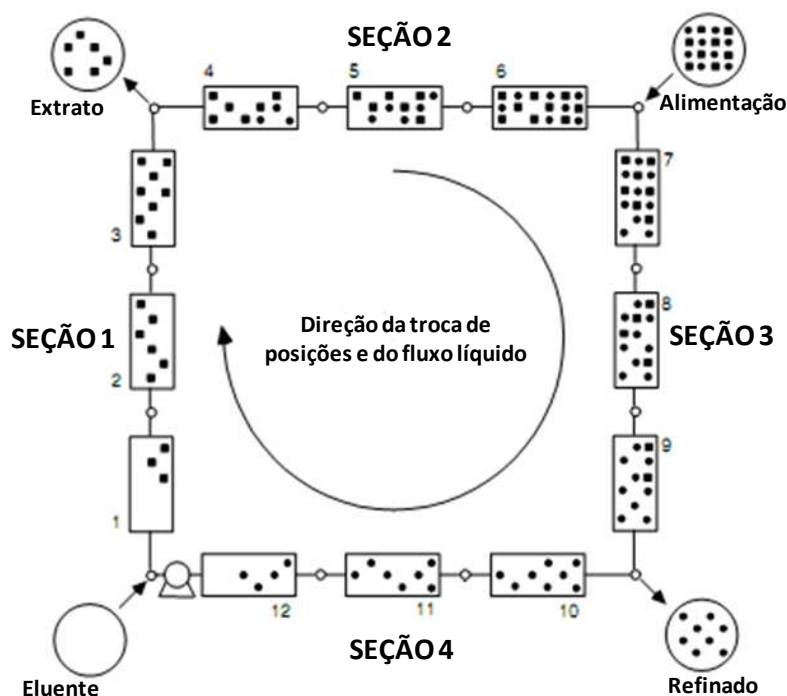


Figura 17. Esquema das quatro seções de uma unidade de Leito Móvel Simulado (LMS) de configuração 3-3-3-3 para separação contínua. (●) composto menos retido; (■) composto mais retido. Adaptado de COX (2005).

Em contraste aos conceitos clássicos no qual o processo do LMS é operado com vazões de entrada, de saída e de alimentação constantes, recentemente a operação do processo LMS foi melhorada por variações de parâmetros operacionais durante os intervalos de troca. O primeiro processo desenvolvido nesta rota foi a unidade denominada VARICOL®, cujas correntes de entrada e saída são trocadas assincronicamente (SCHRAMM *et al.*, 2003). Isto significa que a unidade não é mais completamente equivalente ao LMV, mas que agora possui mais parâmetros a serem aperfeiçoados, ou seja, os tempos de troca dos fluxos de entrada e saída (LUDEMANN-HOMBOURGER *et al.*, 2000; ANDERSSON; ALLENMARK, 2002; PAIS; RODRIGUES, 2003).

A idéia básica do processo VARICOL®, desenvolvido pela Novasep SAS (Pompey, França), fundamenta-se na variação do comprimento das zonas ao longo do tempo, sendo esta variação periódica, o que permite o sistema retornar a sua posição inicial após um determinado

tempo (Figura 18). Vale ressaltar que o comprimento das zonas para LMV permanece fixo (LUDEMANN-HOMBOURGER *et al.*, 2000).

A diferença principal entre o LMS e o VARICOL® é que neste último a injeção e os pontos de coleta não se movem simultaneamente. Isso faz com que o número de colunas em cada zona de separação flutue no tempo, enquanto que o número de colunas em cada zona é mantido constante no processo LMS. Portanto, o VARICOL® otimiza o uso da fase estacionária e geralmente reduz a quantidade de eluente, em que se traduz em economia de energia no processo de concentração dos produtos e reciclo do próprio eluente (LUDEMANN-HOMBOURGER *et al.*, 2000; COX, 2005).

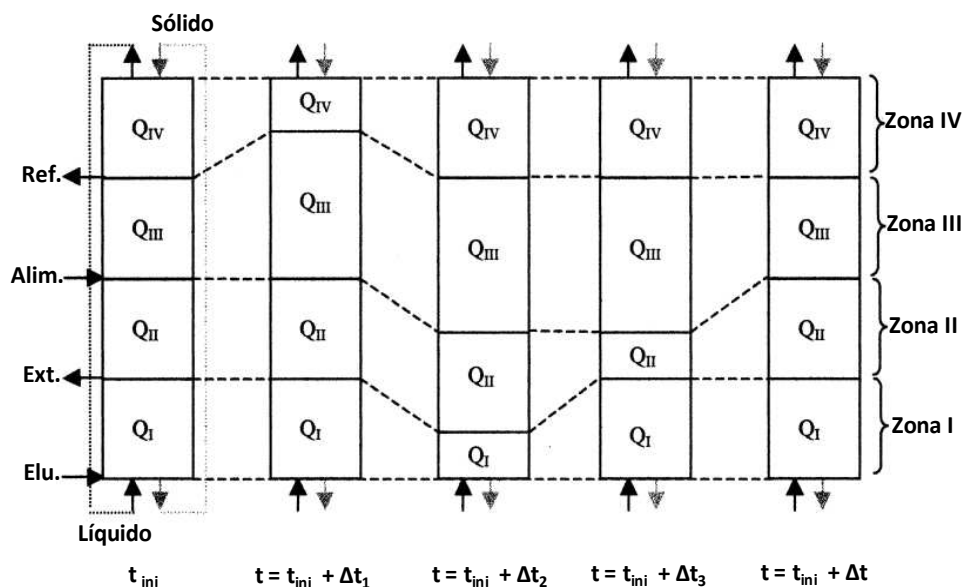


Figura 18. Representação esquemática do processo VARICOL®. Adaptado de LUDEMANN-HOMBOURGER *et al.*, (2000).

O processo de separação para o VARICOL®, assim como para o LMS, pode ser dividido em quatro zonas:

- Zona I: entre as linhas do Eluente e Extrato;
- Zona II: entre as linhas do Extrato e Alimentação;
- Zona III: entre as linhas da alimentação e Refinado;
- Zona IV: entre as linhas do refinado e Eluente.

As linhas de alimentação, eluente, extrato e refinado são mudadas a determinados períodos Δt , seguindo um padrão não-simultâneo associado ao número médio de colunas requerido por zona durante o ciclo. Um ciclo completo é constituído de períodos sucessivos permitindo as diferentes linhas retornarem as suas posições iniciais.

No VARICOL®, ao contrário do LMS, o número médio de colunas, em no mínimo duas zonas, é um número real e não, necessariamente, um número inteiro. Um exemplo de um processo VARICOL® constituído por seis colunas é ilustrado na Figura 19. Observa-se a evolução do número de colunas ao decorrer das zonas de separação. Para essa configuração de leito cromatográfico, pode-se calcular o número médio de colunas durante um período completo. Portanto, na zona I, tem-se uma coluna durante dois quartos do período e duas colunas durante os outros dois quartos. Logo, o número médio de colunas $[N_{C(I)}]$ é dado por:

$$[N_{C(I)}] = 2 \times \frac{1}{4} \times 1 + 2 \times \frac{1}{4} \times 2 = 1,5 \text{ colunas.}$$

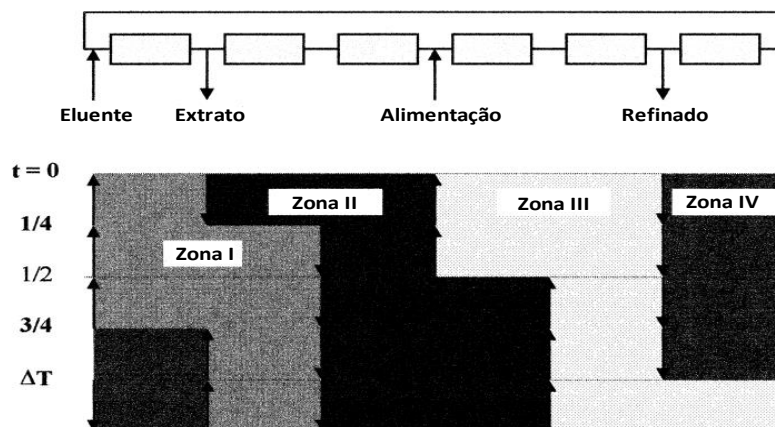


Figura 19. Esquema do funcionamento geral do VARICOL® com relação à entrada e saída das correntes em cada zona de separação. Adaptado de LUDEMANN-HOMBOURGER *et al.*, (2000).

Cálculos similares podem ser realizados nas demais zonas de separação, cujos valores estão dispostos na Tabela 2.

Tabela 2. Cálculo do número médio de colunas nas zonas do VARICOL® (Configuração do leito cromatográfico de acordo com a Figura 19)

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

Fonte: Adaptado de LUDEMANN-HOMBOURGER *et al.*, (2000).

Estudos comparativos teóricos e experimentais comprovaram que a produtividade e consumo de eluente são mais favoráveis para o processo VARICOL® que para o LMS, e a melhoria na produtividade pode ser alcançada com um menor número de colunas (LUDEMANN-HOMBOURGER *et al.*, 2000; LUDEMANN-HOMBOURGER *et al.*, 2002; PAIS; RODRIGUES, 2003).

Diversos são os trabalhos reportados na literatura abordando o VARICOL® como processo de separação cromatográfico contínuo contracorrente. Dentre os mais expressivos, pode-se citar aqueles voltados à separação de biomoléculas, tais como os trabalhos de Subramani *et al.*, (2003), visando o isolamento dos açúcares frutose e glicose e de Rodrigues *et al.*, (2007), enfocando a separação dos nucleosídeos uridina e guanosina; assim como trabalhos voltados a separação de racematos, como o de Ludemann-Hombourger *et al.*, (2002), e de enantiômeros dos fármacos quirais pindolol (ZHANG *et al.*, 2009), mitotano (SILVA Jr. *et al.*, 2012) e albendazol (LOURENÇO *et al.*, 2012).

As variáveis de desempenho, voltadas para a tecnologia de leitos móveis, são caracterizadas por quatro parâmetros: pureza, recuperação, consumo de solvente e produtividade. Para o caso da separação de uma mistura binária, em que os componentes mais retido (B) e menos retido (A) são recuperados no extrato e refinado, respectivamente, os quatro parâmetros do processo são definidos na Tabela 3. Na Tabela, C_A^R e C_A^F são as concentrações de A no refinado e na alimentação, respectivamente; C_B^E e C_B^F são as concentrações de B no extrato e na alimentação, respectivamente; e V_{ads} é o volume da fase sólida (FRANCOTTE; HUYNH, 2002).

As unidades leito móvel geralmente operam sob condições de sobrecarga, provocando melhorias no desempenho da separação, mencionados acima, porém, conduzem a um comportamento não-linear das isotermas de adsorção competitivas. Isto deve ser considerado na seleção das condições operacionais, isto é, concentração de alimentação, tempo de troca e vazões internas da fase fluida (FRANCOTTE *et al.*, 1998). A concentração de alimentação possui uma forte influência no desempenho destes sistemas cromatográficos contínuos; logo, deve ser bem avaliada. A produtividade e o consumo de eluente são os dois principais critérios econômicos envolvidos. A produtividade aumenta e o consumo de eluente diminui quando a concentração de alimentação aumenta. Então, devem-se evitar baixas concentrações de injeção. Entretanto, vale ressaltar que concentrações muito elevadas podem não ser satisfatórias, pois podem conduzir a uma baixa vazão de alimentação, o que pode ser de difícil controle (SILVA JUNIOR *et al.*, 2006).

Tabela 3. Variáveis de desempenho avaliadas no processo Leito Móvel

Variável Desempenho	Extrato	Refinado
<i>Pureza (%)</i>	$\frac{100.C_B^E}{(C_A^E + C_B^E)}$	$\frac{100.C_A^R}{(C_A^R + C_B^R)}$
<i>Produtividade (g.dia⁻¹/kg_{FEQ})</i>	$\frac{Q_E.C_B^E}{V_{ads}}$	$\frac{Q_R.C_A^R}{V_{ads}}$
<i>Recuperação (%)</i>	$\frac{100.C_B^E.Q_E}{C_B^F.Q_B^F}$	$\frac{100.C_A^R.Q_R}{C_A^F.Q_A^F}$
<i>Consumo de solvente (L/kg)</i>	$\frac{(Q^I + Q^F)}{C_T.Q^F}$	

2.9. Estimativa da queda de pressão

As condições ótimas de operação em cromatografia, com propósitos preparativos, geralmente são atingidas quando se utilizam vazões mais altas possíveis, limitadas pela queda de

pressão e pelo desempenho das bombas (KASPEREIT *et al.*, 2002). Como as unidades de leito móvel são projetadas para trabalhar a uma dada pressão, torna-se necessário estabelecer uma relação entre a queda de pressão na coluna cromatográfica (por unidade de comprimento) ($\Delta P/L$) e a velocidade intersticial da fase móvel (equação de Darcy). A equação de Kozeny-Carman (Equação (33)) é satisfatória para fluxos laminares utilizados em cromatografia (NICOUD, 1999; SILVA JUNIOR, 2006).

$$\frac{\Delta P}{L} = \frac{\eta_m}{\kappa} u = \left[\frac{\eta_m}{\frac{d_p^2 \varepsilon^3}{36 \cdot \beta \cdot (1 - \varepsilon)^2}} \right] u \quad (33)$$

em que κ representa a permeabilidade do leito, β o coeficiente de Kozeny (valor aproximado de 4,5), d_p o diâmetro das partículas e η_m a viscosidade da fase móvel.

Capítulo 3

MATERIAIS E MÉTODOS

Neste capítulo são apresentadas as descrições dos materiais e métodos empregados para a realização dos experimentos. Os métodos foram divididos em três seções: (i) experimentos preliminares, voltados ao *screening* da fase móvel, bem como a avaliação da resposta do sistema de detecção e estimativa da queda de pressão da coluna; (ii) experimentos com soluções diluídas para a caracterização de colunas cromatográficas e obtenção dos parâmetros cromatográficos de separação, de equilíbrio de adsorção, termodinâmicos e de transferência de massa; e (iii) experimentos com soluções concentradas, referentes ao estudos de sobrecarga na coluna, determinação de isothermas de adsorção não-lineares; avaliação da separação enantiomérica nas unidades de leito móvel, voltada a obtenção e análise de parâmetros operacionais e de variáveis de desempenho do processo; e caracterização dos enantiômeros.

3.1. MATERIAIS

3.1.1. O verapamil

O verapamil (lote M185417), utilizado neste trabalho, foi gentilmente fornecido pela EMS® Indústria Farmacêutica (Hortolândia, SP) como mistura racêmica em quantidade na ordem de 200 gramas. A Figura 2 apresenta a estrutura química dos enantiômeros do fármaco, cujo centro de quiralidade está situado no átomo de carbono.

3.1.2. Compostos inertes

A determinação dos tempos de retenção de um componente não retido pela fase estacionária foi realizada pelo composto 1,3,5-tri-*tert*-butil-benzeno (TTBB) (Figura 20a), adquirido da Sigma-Aldrich® (EUA). O TTBB é uma molécula de tamanho relativamente pequeno com massa molar igual a 246,44 g/mol, sendo capaz de penetrar nos poros das partículas do leito empacotado sem ser adsorvido na superfície da fase estacionária. Por ser considerado não retido em grande parte das fases estacionárias utilizadas para separações enantioméricas, o composto foi escolhido para a determinação da porosidade total da coluna cromatográfica.

Para a determinação da porosidade do leito, foi utilizado um padrão de poliestireno de alta massa molar ($5,40 \times 10^5$ g/mol) (Figura 20b), adquirido da Sigma-Aldrich (EUA) Esse polímero, por ser um composto inerte e de tamanho molecular relativamente grande, não penetra nos poros das partículas e atravessa, somente, os interstícios das partículas da FEQ sem ser adsorvido.

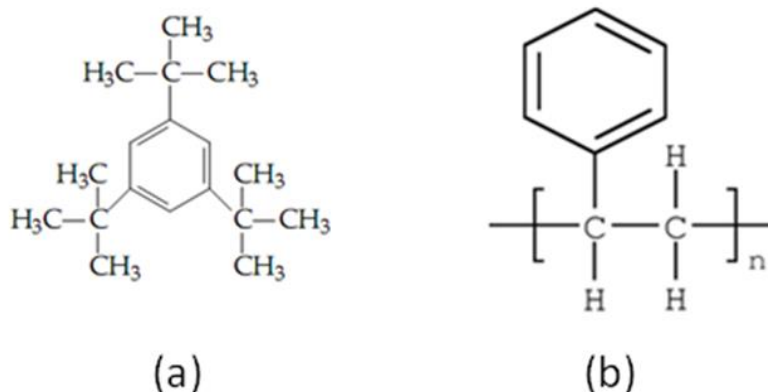


Figura 20. Estrutura molecular dos compostos (a) TTBB e (b) poliestireno.

3.1.3. Solventes orgânicos

Os solventes utilizados para a composição da fase móvel e preparo das amostras foram o *n*-hexano 95%, isopropanol 100% e etanol 100%, todos de grau cromatográfico e adquiridos da TEDIA® (EUA). A dietilamina 99,5%, utilizada como aditivo básico, foi adquirida da Sigma-Aldrich (EUA).

3.1.4. Fase estacionária quiral

No presente trabalho foram utilizadas colunas cromatográficas de aço inoxidável recheadas com a fase estacionária quiral tris (3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose (Figura 21). Foram utilizadas colunas semi-preparativas Chiralpak® AD (100 x 10 mm, 20 μ m), adquiridas da Chiral Technologies® (Tóquio, Japão) para estudos de separação de misturas racêmicas de verapamil diluídas e concentradas; e uma coluna analítica (250 x 4,6 mm, 10 μ m), também adquirida da Chiral Technologies® empregada para a obtenção das purezas dos enantiômeros do fármaco previamente separados na unidade cromatográfica contínua.

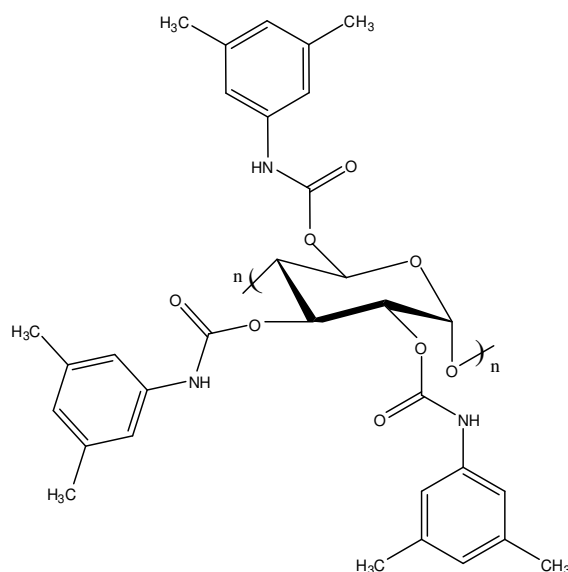


Figura 21. Estrutura química da fase estacionária quiral tris (3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose.

3.1.5. Aparelhagem experimental

3.1.5.1. Cromatógrafo a líquido

Os experimentos foram realizados em um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (Figura 22), constituído por uma bomba Modelo LC-20AT, por um detector UV-VIS Modelo SPD-20A e por uma controladora Modelo CBM-20A/UFLC, todos da marca Shimadzu Corporation® (Kyoto, Japão). No sistema também estão presentes uma válvula injetora do tipo Rheodyne Modelo 7725i (EUA), e um polarímetro Modelo P-1010 da Jasco® (Japão). Todos os equipamentos são integrados a um sistema de aquisição de dados, constituído por um micro-computador Intel Celeron® de 1.81 GHz, no qual se encontra disponível o software LC solution® versão 1.23 da Shimadzu Corporation® (Kyoto, Japão), indispensável para o registro, obtenção de cromatogramas e fornecimento de dados experimentais úteis para a quantificação dos parâmetros de separação dos enantiômeros do verapamil.

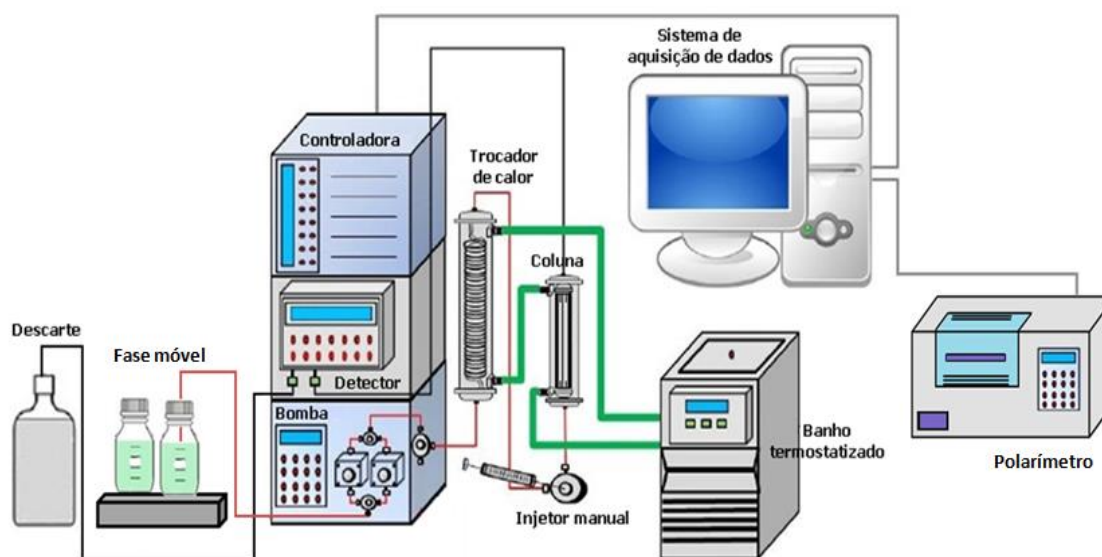


Figura 22. Representação esquemática do aparato experimental do sistema de cromatografia líquida de alta eficiência.

As amostras foram injetadas manualmente com o auxílio de uma seringa de vidro de 250 μL Modelo Microliter™ 725 (Hamilton Co., EUA) e a temperatura da coluna cromatográfica foi controlada utilizando-se um banho termostatzado Modelo SL 152 da Solab® (Brasil). Como equipamentos secundários, foram utilizados uma balança analítica Modelo AJ150 da Mettler®

(Suíça) para preparação das amostras do fármaco e um banho ultra-sônico Modelo 8892R-MT da Cole Parmer[®] (EUA) para a desgaseificação da fase móvel.

3.1.5.2. Unidade cromatográfica contínua

A unidade cromatográfica contínua, adquirida da Novasep SAS (Pompey, França) e utilizada neste trabalho (Figura 23), foi operada nos modos LMS e VARICOL[®]. Sua capacidade de processamento pode variar de 1 a 50 gramas de mistura racêmica por dia, dependendo da concentração de alimentação, tamanho e número de colunas utilizadas. A unidade é constituída por seis colunas semi-preparativas Chiralpak[®] AD (100 x 10 mm, 20 µm) de aço inoxidável conectadas em série, totalizando uma massa de 36 gramas de fase estacionária quiral.

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

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

Finalizando, a unidade ainda contém um sistema de controle, gerenciado pelo software Proficy HMI/SCADA-iFIX[®] da GE FANUC Automation[®], presente em um micro-computador Siemens AG Intel Core 2 2.40 GHz, o qual é projetado para monitorar o processo da separação cromatográfica. Além do sistema de controle, a unidade vem acompanhada de outro software, denominado *HELP*[®] versão 10.3, que permite determinar ferramentas importantes de análise como a isoterma de adsorção a partir de dados cromatográficos obtidos com uma coluna em

laboratório. Este software permite ainda projetar os parâmetros operacionais (vazões de entrada e saída e tempo de troca das correntes) e estimar valores de algumas variáveis de desempenho importantes como o consumo de solvente e a produtividade ao decorrer do processo de separação.

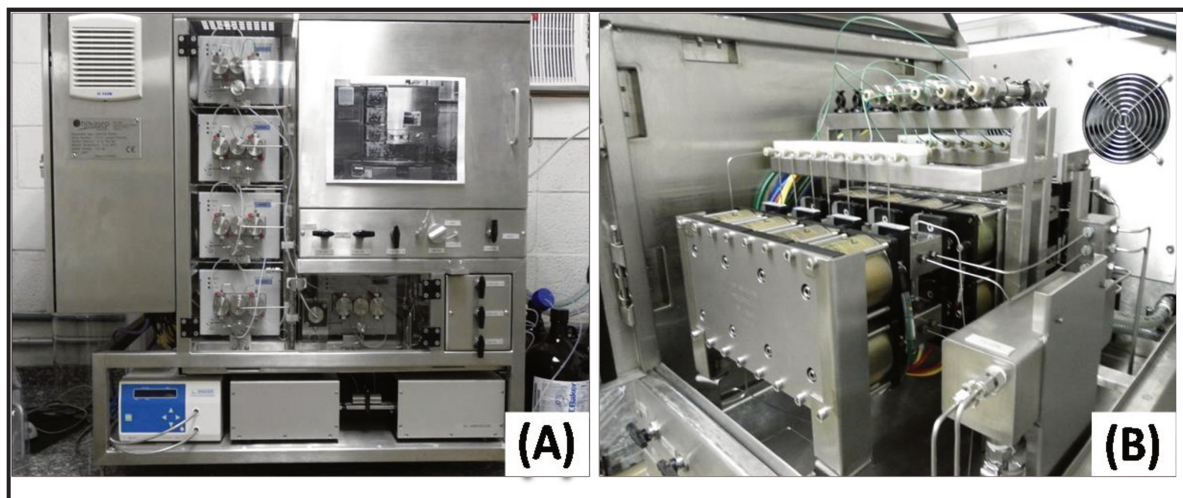


Figura 23. Unidade cromatográfica contínua: (A) visão externa; (B) visão interna.

3.2. MÉTODOS

3.2.1 EXPERIMENTOS PRELIMINARES

3.2.1.1. Seleção e *screening* da fase móvel

Foram realizados estudos com várias combinações de solventes em diferentes proporções a fim de se identificar qual destas combinações resultaria em uma fase móvel mais adequada para posterior análise da separação da mistura enantiomérica.

Para a obtenção da fase móvel, foram selecionados os solventes *n*-hexano, isopropanol e etanol além da dietilamina como aditivo básico. Os solventes foram selecionados conforme pesquisa prévia na literatura e consultas a catálogos da Chiral Technologies Europe®. Primeiramente, foram realizados experimentos de *screening* para fases móveis binárias, tomando-se como solvente principal o *n*-hexano, nas proporções de 80 a 95 % (em volume). Isopropanol e etanol, definidos como modificadores polares, foram combinados individualmente com *n*-hexano

nas proporções de 5 a 20 % (em volume). A proporção de dietilamina foi fixada a 0,1 % (em volume).

Posteriormente, foram realizados experimentos de *screening* para fases móveis ternárias, variando-se as proporções dos solventes isopropanol e etanol, simultaneamente, de 2,5 a 7,5 % (em volume), e mantendo-se constante a percentagem de dietilamina (0,1 %, em volume) e a melhor proporção de *n*-hexano, obtida nos experimentos de *screening* para fases móveis binárias.

Os experimentos foram realizados em duplicata, através de injeções de 20 μL da amostra racêmica de verapamil a uma concentração total de 0,5 mg mL^{-1} , vazão de 1,0 mL min^{-1} e temperatura de 25 °C. O valor do comprimento de onda (λ), programado no sistema de detecção, foi de 270 nm.

3.2.1.2. Análise da resposta do sistema de detecção

Para verificar a faixa de comprimento de onda na qual se devem conduzir os experimentos, obteve-se um espectro no UV-VIS para a mistura racêmica do verapamil. O espectrofotômetro foi calibrado com a solução contendo apenas a fase móvel *n*-hexano/isopropanol/etanol/dietilamina (90/5/5/0,1 %, v/v/v/v). Posteriormente, foi preparada uma amostra, em fase móvel, contendo a mistura racêmica do fármaco na concentração de 0,5 mg mL^{-1} . Então, realizou-se a varredura entre 230 a 310 nm, obtendo-se, finalmente, o espectro de absorção para o verapamil para diferentes comprimentos de onda (Apêndice A).

3.2.1.3. Avaliação da queda de pressão

A avaliação da queda de pressão foi realizada com experimentos no sistema CLAE a diferentes vazões da fase móvel (1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0; e 6,0 mL min^{-1}). Foram obtidos diferentes valores de pressão e, a partir desses dados, determinou-se uma relação linear entre a queda de pressão da coluna ($\Delta P/L$) e a velocidade intersticial (u) da fase móvel, descrita pela Equação (33), de Kozeny-Carman. A permeabilidade do leito (κ) foi determinada pela inclinação da reta, obtida experimentalmente.

3.2.2. EXPERIMENTOS COM SOLUÇÕES DILUÍDAS

3.2.2.1. Determinação das porosidades

A caracterização geométrica das colunas semi-preparativas foi realizada através de experimentos de pulsos cromatográficos utilizando-se os compostos 1,3,5-tri-*terc*-butil-benzeno (TTBB) e poliestireno para se obter as porosidades total (ε_T) e do leito (ε), respectivamente, assim como determinar a porosidade das partículas (ε_P) e verificar a homogeneidade do empacotamento.

Para a obtenção da porosidade total, dissolveu-se TTBB na própria fase móvel, constituída de uma mistura de *n*-hexano: isopropanol: etanol (90:5:5 %, v/v/v) resultando em uma solução com concentração de 0,5 mg mL⁻¹. Foram injetados no sistema cromatográfico 20 µL desta solução, sob condições isocráticas, a diferentes vazões de fase móvel (1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0 mL min⁻¹). Os experimentos foram realizados em triplicata com temperatura constante e igual a 25 °C e com respostas dos pulsos monitoradas pelo detector UV no comprimento de onda de 270 nm.

Para a obtenção da porosidade do leito, pequenos pulsos cromatográficos (20 µL) foram realizados, em duplicata, com solução diluída (0,5 mg mL⁻¹) de poliestireno dissolvidos em tetrahydrofurano (THF), variando a vazão da fase móvel (1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0 mL min⁻¹) à temperatura de 25 °C. Nesses experimentos, a fase móvel utilizada constituiu-se por etanol (100 %, em volume) acrescida de 0,1 % (em volume) do aditivo ácido trifluoroacético (TFA). As respostas dos pulsos cromatográficos foram detectadas a 260 nm.

Os valores das porosidades total e do leito foram determinados, experimentalmente, a partir da análise do primeiro momento, obtido pela integração das respostas dos pulsos cromatográficos. Sendo o TTBB e o poliestireno compostos inertes, o termo referente à adsorção (K_P) na Equação (8) pode ser desprezado e as porosidades podem ser determinadas através da inclinação da reta. A reta é obtida pela Equação (34), reescrita em função da velocidade superficial (v) a partir da Equação (8), em que são plotados, no eixo da ordenada, os valores do primeiro momento (μ_1), iguais aos respectivos tempos de retenção do TTBB ou do poliestireno e,

na abscissa, os valores da razão (L/v), em que L representa o comprimento da coluna cromatográfica.

$$\mu_1 = t_R = \frac{L}{v} [\varepsilon + (1 - \varepsilon) \varepsilon_p] + \frac{t_{inj}}{2} = \frac{L}{u} \varepsilon_T + \frac{t_{inj}}{2} \quad (34)$$

O valor da porosidade da partícula foi obtido pela Equação (35), dada por:

$$\varepsilon_T = \varepsilon + (1 - \varepsilon) \cdot \varepsilon_p \quad (35)$$

3.2.2.2. Determinação dos parâmetros cromatográficos

O estudo da separação cromatográfica do verapamil foi realizado mediante a preparação de soluções, na própria fase móvel, do fármaco racêmico e de TTBB nas concentrações de 0,5 mg mL⁻¹.

Os experimentos foram conduzidos, em triplicata, com a injeção de pequenos pulsos (20 µL) no sistema cromatográfico, constituído por uma coluna semi-preparativa Chiralpak® AD (100 x 10 mm, 20 µm), sob condições isocráticas à vazão de 1,0; 1,5; 2,0 e 2,5 mL min⁻¹ para as temperaturas de 15, 20, 25, 30 e 35 °C. As respostas foram monitoradas pelo detector UV no qual foi fixado o comprimento de onda em 270 nm.

Com os valores de tempos de retenção obtidos para os enantiômeros, foi possível determinar os fatores de retenção (k_i), a seletividade ou fator de separação (α) e a resolução (R_s) através das Equações (1), (2) e (4), respectivamente. O TTBB, como não interage com a fase estacionária, foi utilizado para a obtenção dos tempos mortos (ou retardamento) t_o , indispensável para cálculos dos parâmetros cromatográficos, nas diferentes vazões e temperaturas estudadas.

3.2.2.3. Determinação das constantes de equilíbrio de adsorção: constantes de Henry

As constantes de equilíbrio de adsorção (K_P) foram determinadas a partir de valores de tempos de retenção dos enantiômeros, obtidos para diferentes vazões (1,0; 1,5; 2,0; 2,5 mL min⁻¹) e temperaturas (15, 20, 25, 30, 35 °C), conforme Seção 3.2.2.2.

Para a determinação das constantes de adsorção, aplicou-se o método do primeiro momento (Equação 8). Partindo-se dos valores das porosidades do leito (ε) e das partículas (ε_P), assim como de valores dos coeficientes angulares (ψ), obtidos através de gráficos dos momentos (t_R versus (L/u)), foi possível calcular os valores das constantes K_P a partir da Equação (36).

$$\psi = \left[1 + \left(\frac{1 - \varepsilon}{\varepsilon} \right) \varepsilon_P + \left(\frac{1 - \varepsilon}{\varepsilon} \right) (1 - \varepsilon_P) K_P \right] \quad (36)$$

em que K_P é igual a constante de Henry (He) ($K_P = He$) para soluções diluídas.

Como alternativa, He também pode ser obtida a partir da Equação (37), levando-se em consideração os valores da porosidade total (ε_T) e os tempos morto (t_0) e de retenção (t_{Ri}) dos enantiômeros para diferentes vazões e temperaturas (PEDEFERRI *et al.*, 1999; KOSTOVA; BART, 2007).

$$He_i = \frac{(t_{R,i} - t_0)}{t_0} \frac{\varepsilon_T}{(1 - \varepsilon_T)} \quad (37)$$

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

Os coeficientes de dispersão axial (D_L) e de transferência de massa global (k_m) foram determinados a partir da solução racêmica de verapamil (0,5 mg mL⁻¹) em diferentes temperaturas (15, 20, 25, 30 e 35 °C) e vazões de fase móvel (1,0; 1,5; 2,0; 2,5 mL min⁻¹), conforme Seção 3.2.2.2.

Tomando-se os dados experimentais obtidos, foram calculados o número de pratos (N_P) e os valores de altura equivalente a um prato teórico ($HETP$) através das Equações (3) e (12),

respectivamente. Então, construíram-se gráficos de *HETP* em função de *u* (velocidade intersticial) para ambos os enantiômeros em diferentes temperaturas e fizeram-se ajustes dos dados tomando-se, como referência, a equação modificada de van Deemter (Equação 15).

A partir dos ajustes, foram determinados os valores dos coeficientes *A* e *C* da curva de van Deemter, e, então, calculados os valores de *D_L* e *k_m*, recorrendo-se às Equações (16) e (17), respectivamente.

3.2.2.5. Determinação dos parâmetros termodinâmicos de adsorção

Para a determinação dos parâmetros termodinâmicos de adsorção, foram considerados os fatores de retenção (*k*) e separação (*α*), obtidos experimentalmente conforme Seção 3.2.2.2, para temperaturas de 15, 25 e 35 °C e vazão de 1,0 mL min⁻¹ para a fase móvel.

As variações de entalpia (*ΔH*) e entropia (*ΔS*) foram determinadas pela Equação (25) através de gráficos lineares de ln *k* em função do inverso da temperatura, cuja inclinação e intersecção da reta possibilitaram obter os termos entálpico e entrópico, respectivamente. O mesmo procedimento foi utilizado para determinar os parâmetros referentes às diferenças de variação de entalpia *Δ(ΔH)* e entropia *Δ(ΔS)*, recorrendo-se a Equação (26). A temperatura de isoenantiosseletividade (*T_{iso}*) foi obtida através da Equação (27).

3.2.3. EXPERIMENTOS COM SOLUÇÕES CONCENTRADAS

3.2.3.1. Estudo de sobrecarga na coluna

A determinação dos perfis de eluição sob condições de sobrecarga na coluna cromatográfica semi-preparativa foi realizada com o intuito de se avaliar o comportamento da separação dos enantiômeros do verapamil em condições de alta concentração e auxiliar na obtenção das isotermas de adsorção não-lineares, fornecendo dados suficientes para a determinação da produtividade máxima da coluna cromatográfica.

Os perfis de eluição dos enantiômeros de verapamil foram obtidos pela injeção de volumes crescentes (20, 50, 100, 200, 500, 600 e 800 μL) de solução racêmica concentrada

(10 g L⁻¹). Os experimentos foram realizados sob condições isocráticas, a uma vazão de 1,0 mL min⁻¹ e temperatura controlada de 25 °C. As respostas foram monitoradas pelo sistema de detecção UV-VIS no comprimento de onda de 260 nm.

3.2.3.2. Determinação das isothermas de adsorção

No presente trabalho, as isothermas de adsorção competitivas dos enantiômeros de verapamil foram obtidas pelo método dinâmico da *Análise Frontal* e pela aplicação do *Software HELP*® versão 10.3, desenvolvido pela Novasep SAS (Pompey, França).

Método da Análise Frontal

As isothermas de adsorção dos enantiômeros de verapamil foram determinadas a partir das curvas de ruptura (breakthrough) para diferentes concentrações da mistura racêmica do fármaco (0,5; 1,0; 2,5; 5,0; 7,5 e 10,0 g L⁻¹). Os experimentos foram conduzidos à temperatura controlada de 25 °C, vazão de fase móvel (eluente) e alimentação da mistura iguais a 2,0 mL min⁻¹ e comprimento de onda de 270 nm. Introduziu-se no sistema CLAE (Figura 22) uma segunda bomba (bomba de alimentação), visando impulsionar a solução contendo a mistura racêmica.

Em princípio, a coluna cromatográfica foi condicionada com a fase móvel até se atingir o estado de equilíbrio, ou seja, até que a resposta do sistema de detecção permanecesse invariável. Então, programou-se uma repentina troca de posições do sistema CLAE de forma que a bomba de alimentação substituísse a bomba de eluente e, portanto, passasse a injetar uma solução de concentração conhecida de verapamil racêmico. Um volume contínuo da solução foi alimentado até a saturação da coluna (28 mL), condição na qual a concentração na saída do detector foi a mesma da alimentação do sistema (etapa de adsorção) que pode ser observada pela presença de um platô superior nas curvas de ruptura (Figura 14).

Atingida esta condição, houve a mudança imediata para a bomba do eluente e, assim, manteve-se o experimento até a completa eluição do verapamil da coluna (etapa de dessorção). Repetiu-se o procedimento para as diferentes concentrações sendo que, cada uma delas, representou um ponto na isoterma de adsorção. Durante a obtenção das curvas de ruptura,

amostras foram coletadas em intervalos de tempo de 1 minuto visando traçar os perfis de concentração para ambos os enantiômeros recorrendo-se a suas respectivas curvas analíticas (Apêndice B).

Aplicando-se a *derivada primeira* nas curvas de ruptura, determinaram-se os valores dos tempos de retenção da primeira e segunda frente de adsorção (pontos de máximo) e, através dos perfis de concentração, as concentrações nos platôs intermediário e superior para ambos os enantiômeros (Figura 14).

Finalmente, conhecido o volume de adsorvente, foi possível calcular os pontos da isoterma de adsorção pela Equação (18) e, através do software MATLAB® versão R2009b, fazer o ajuste da curva ao modelo selecionado da isoterma competitiva e obter os parâmetros de adsorção.

Software HELP®

Para se obter as isotermas de adsorção competitivas para ambos os enantiômeros do fármaco verapamil através do software *HELP®* versão 10.3, fez-se necessário recorrer aos valores experimentais de tempos de retenção, obtidos por pulsos analíticos e de tempos de retenção à meia altura das frentes dos picos cromatográficos (Figura 24), determinados a partir de estudos de sobrecarga na coluna, conforme descrito na Seção 3.2.3.1.

O software *HELP®* foi desenvolvido pela Novasep SAS (Pompey, França) baseado nos estudos de Nicoud e Seidel-Morgenstern (1996); considera o modelo de isoterma de adsorção do tipo *Langmuir Competitiva Modificada* (Equação 23), comumente empregado na área das separações quirais. O modelo proposto pelo software, conforme descrito (Seção 2.5.3), contém os termos linear, associado aos sítios de adsorção não-seletivos da fase estacionária quiral, e não-linear, relacionado aos sítios de adsorção enantiosseletivos.

As isotermas competitivas para os enantiômeros do fármaco e seus respectivos parâmetros de adsorção foram obtidos através das seguintes etapas:

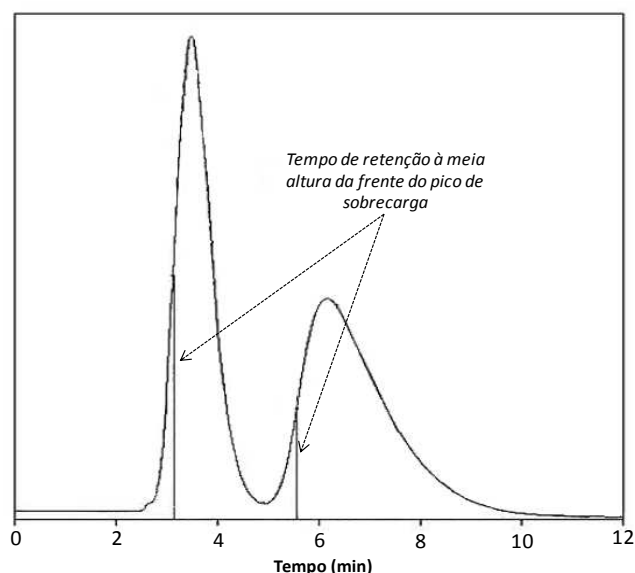


Figura 24. Visualização gráfica dos tempos de retenção à meia altura da frente dos picos cromatográficos obtidos para os enantiômeros sob condições de sobrecarga da coluna.

(i) Inicialmente, na janela de entrada do software foram inseridos os valores dos parâmetros geométricos da coluna cromatográfica (diâmetro e comprimento da coluna, além do tamanho das partículas) e as condições de injeção analítica (vazão e tempo de retenção dos enantiômeros) (Figura 25);

(ii) Posteriormente, foram inseridos os dados de injeções de sobrecarga (vazão, volume de injeção, concentração dos enantiômeros e seus respectivos tempos de retenção à meia altura das frentes dos picos cromatográficos) (Figura 26).

(iii) Com todos os dados experimentais alimentados em ambas as janelas do software, foi possível obter os parâmetros da isoterma de adsorção, pressionando-se o ícone “calculate” (Figura 26). Vale ressaltar que os parâmetros λ_i , N e K_i , apresentados pela isoterma do software, correspondem, na Equação (23), aos parâmetros h_i , q_s e b_i , respectivamente.

The screenshot shows a software window titled 'Help 10.3' with a menu bar (Files, View, ?) and three tabs: 'Analytical injection', 'Adsorption isotherm', and 'Hydrodynamics'. The 'Analytical injection' tab is active. It contains two main sections: 'Column parameters' and 'Analytical injection'.

Column parameters:

- Column diameter (cm) [input field]
- Column length (cm) [input field]
- Bed density (kg/L) [input field]
- Particle size (um) [input field]

Analytical injection:

- Flowrate (mL/min) [input field]
- Retention time 1 (min) [input field]
- Retention time 2 (min) [input field]

Figura 25. Janela de dados de entrada referentes aos parâmetros geométricos da coluna e de injeção analítica.

The screenshot shows the same 'Help 10.3' window, but with the 'Hydrodynamics' tab selected. It features a table for 'Overloaded injections' and a section for 'Isotherms parameters'.

Overloaded injections:

	Q (mL/min)	V _{inj} (uL)	C ₁ (g/L)	C ₂ (g/L)	tr ₁ (min)	tr ₂ (min)
inj 1						
inj 2						
inj 3						
inj 4						
inj 5						
inj 6						

Isotherms parameters:

The section displays the equation:
$$\bar{C}_i = \lambda \cdot C_i + \frac{N \tilde{K}_i C_i}{1 + \tilde{K}_1 C_1 + \tilde{K}_2 C_2}$$

Below the equation, there are input fields for parameters λ , $N\tilde{K}_1$, and N . The first two are labeled 'Esp1' and 'Esp2'.

At the bottom right, there are two buttons: 'CALCULATE' and 'VERIFY'.

Figura 26. Janela de dados de entrada e saída referentes às medidas de sobrecarga e aos parâmetros da isoterma de adsorção.

3.2.3.3. Obtenção dos parâmetros operacionais e das variáveis de desempenho dos processos LMS e VARICOL®

A obtenção dos parâmetros operacionais (vazões de entrada e saída do processo e tempo de troca) e das variáveis de desempenho (pureza, produtividade, recuperação e consumo de solvente) é de suma importância para operar as unidades LMS e VARICOL® e verificar a eficiência do processo de separação cromatográfico contínuo.

Parâmetros operacionais

Os parâmetros operacionais foram obtidos através do software *HELP*®, levando-se em consideração dados experimentais de injeção analítica e do comportamento hidrodinâmico relacionado a eficiência da coluna e a queda de pressão do sistema. Considerou-se, ainda, dados da isoterma competitiva de adsorção e características geométricas da coluna.

Seguem, abaixo, as etapas envolvidas na obtenção das condições operacionais das unidades LMS e VARICOL®:

Etapla 1: Nesta etapa, conforme apresentada na Seção 3.2.3.2, foram inseridos os valores de parâmetros geométricos da coluna (comprimento efetivo, diâmetro interno e tamanho das partículas) e dados de injeção analítica utilizados no sistema CLAE (vazão de fase móvel e tempos de retenção dos enantiômeros) (Figura 25).

Etapla 2: Foram inseridos os dados experimentais de injeções de sobrecarga (vazão, volumes de injeção, concentração dos enantiômeros de verapamil e seus respectivos tempos de retenção à meia altura das frentes dos picos cromatográficos) e parâmetros da isoterma de adsorção (Figura 26).

Etapla 3: Foram inseridos os dados referentes à eficiência da coluna cromatográfica (número de pratos e suas respectivas vazões de fase móvel) e queda de pressão) (Figura 27).

Etapla 4: Nesta etapa foram inseridos dados referentes ao processo de separação cromatográfico contínuo. Alimentou-se, no software, dados relacionados à pressão de operação, dimensão geométrica das colunas, a concentração da mistura racêmica de verapamil na fase móvel e a percentagem molar dos enantiômeros contidos na mistura (Figura 28).

Help 10.3
Files View ?

Analytical injection | Adsorption isotherm | Hydrodynamics

Column efficiency

Flowrate (mL/min)

Number of plates

HETP (cm) = dp (cm) + u (cm/sec)

Pressure drop

Flowrate (mL/min)

Pressure (bar)

ΔP_L (bar/cm) = u (cm/sec)

Figura 27. Dados do comportamento hidrodinâmico do processo referentes à eficiência da coluna e queda de pressão.

Etapa 5: Nesta etapa são obtidos os parâmetros operacionais do processo. Portanto, são fornecidos os valores das correntes de reciclo, extrato, alimentação e refinado, gerados a partir da introdução dos dados experimentais apresentado nas etapas anteriores. Também são fornecidos o período para as trocas das posições das correntes, o número de colunas por seção (ou zona) de transferência de massa e o número de pratos por coluna (Figura 29).

Help 10.3
Files View ?

VariCol data | VariCol parameters | VariCol simulation | VariCol performances

VariCol data

Maximal pressure (bar)

Column diameter (cm)

Column length (cm)

Feed data

Feed solubility (g/L)

% Component 1

Pulse injection

☐ Data available

Figura 28. Dados referentes ao processo e a alimentação da mistura racêmica.

The screenshot shows the 'VariCol parameters' tab of the VariCol 10.3 software. The interface includes a menu bar with 'Help 10.3', 'Files', and 'View ?'. Below the menu bar are four tabs: 'VariCol data', 'VariCol parameters' (selected), 'VariCol simulation', and 'VariCol performances'. The main area is divided into three sections: 'VariCol parameters' on the left, 'Number of column per zone' on the right, and 'Feed concentration (g/L)' at the bottom left. The 'VariCol parameters' section contains five input fields: 'Qrec (mL/min)', 'Qext (mL/min)', 'Qfeed (mL/min)', 'Qrefl (mL/min)', and 'Period (min)'. The 'Number of column per zone' section contains four input fields for 'Zone 1', 'Zone 2', 'Zone 3', and 'Zone 4', followed by a label 'Total number of columns : 6.00' and an input field for 'Number of plates /column'. The 'Feed concentration (g/L)' section contains two input fields for 'esp 1' and 'esp 2'. At the bottom right, there are two buttons: 'Proposed flow rates' and 'Process Calculation'.

Figura 29. Dados referentes aos parâmetros operacionais a serem introduzidos na unidade de separação cromatográfica contínua multicolumnas.

Variáveis de desempenho

As variáveis de desempenho foram obtidas pelo conjunto de equações definido na Tabela 3 (Seção 2.8). As concentrações dos enantiômeros, presentes nas equações, para as correntes de extrato e refinado foram obtidas a partir das curvas analíticas (Apêndice B).

3.2.3.4. Caracterização dos enantiômeros

Os enantiômeros, separados na unidade cromatográfica contínua, foram caracterizados por polarimetria mediante determinação de suas respectivas rotações ópticas específicas $[\alpha_D]$. As amostras coletadas nas correntes de extrato e refinado foram concentradas a vácuo e, soluções foram preparadas em etanol (grau cromatográfico) na concentração de 50 mg mL^{-1} e submetidas em polarímetro, conforme método reportado por Bhushan e Gupta (2005).

Capítulo 4

RESULTADOS E DISCUSSÕES

No presente capítulo serão apresentados os resultados obtidos a partir dos experimentos realizados em laboratório. Estes resultados serão discutidos com base na literatura, visando demonstrar sua consistência. A princípio, serão apresentados resultados referentes aos experimentos preliminares e, posteriormente, resultados obtidos através de soluções diluídas e concentradas da mistura racêmica. O capítulo será finalizado com dados experimentais dos processos cromatográficos contínuos LMS e VARICOL® referentes a aspectos operacionais e de desempenho das unidades de separação.

4.1. EXPERIMENTOS PRELIMINARES

4.1.1. Seleção e *screening* da fase móvel

Sendo previamente selecionado, no presente trabalho, o polímero modificado tris (3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose como fase estacionária quiral, realizou-se um estudo para definir a fase móvel.

A princípio, foram selecionados os solventes *n*-hexano como componente principal, os alcoóis isopropanol e etanol como modificadores polares, e dietilamina como aditivo básico. Normalmente, aminas são adicionadas na fase móvel para melhorar a simetria dos picos cromatográficos quando se promovem separações quirais de analitos básicos em fases estacionárias polissacarídicas (YE; STRINGHAM, 2001; STRINGHAM *et al.*, 2004). Os solventes foram selecionados conforme pesquisa prévia na literatura (FIEGER; BLASCHKE,

1992; SHIBUKAWA; WAINER, 1992; MATEUS *et al.*, 2007) e consultas a catálogos técnicos da Chiral Technologies Europe®.

Durante os experimentos de *screening* para fases móveis binárias, as proporções de *n*-hexano e dos alcoóis, na mistura, foram variadas de 80 % a 95 % (em volume) e de 5 % a 20 % (em volume), respectivamente, mantendo-se fixa a proporção de dietilamina em 0,1 % (em volume). Os experimentos foram realizados em duplicata, pela injeção de 20 µL de solução racêmica de verapamil (0,5 mg mL⁻¹) em coluna Chiralpak® AD (100 x 10 mm, 20 µm), com vazão de 1,0 mL min⁻¹ para a fase móvel, temperatura de 25 °C e comprimento de onda de 270 nm.

As proporções das misturas dos solventes estudadas e seus respectivos parâmetros cromatográficos (resolução e seletividade), estabelecidos como critério para se avaliar a seleção da melhor fase móvel, são mostrados na Tabela 4.

Tabela 4. Proporção de solventes na mistura e seus respectivos parâmetros cromatográficos (resolução e seletividade) para seleção da fase móvel

Solvente	Proporção	Parâmetros de avaliação	
	% (em volume)	Resolução (<i>R_s</i>)	Seletividade (<i>α</i>)
HEX: IPA: DEA	80: 20: 0,1	0,91 ± 0,01	1,26 ± 0,01
	85: 15: 0,1	0,99 ± 0,02	1,27 ± 0,01
	90: 10: 0,1	1,39 ± 0,02	1,31 ± 0,05
	95: 5: 0,1	1,64 ± 0,07	1,31 ± 0,03
HEX: EtOH: DEA	80: 20: 0,1	0,74 ± 0,06	1,17 ± 0,02
	85: 15: 0,1	0,81 ± 0,08	1,16 ± 0,01
	90: 10: 0,1	0,84 ± 0,03	1,15 ± 0,03
	95: 5: 0,1	1,04 ± 0,05	1,15 ± 0,01

HEX: *n*-hexano; IPA: isopropanol; EtOH: etanol; DEA: dietilamina.

Conforme os resultados obtidos (Tabela 4), a mistura constituída pelos solventes *n*-hexano, isopropanol e dietilamina nas proporções de 95, 5 e 0,1 % (em volume), respectivamente, proporcionou os melhores valores de resolução e seletividade. Contudo, para esta composição de fase móvel, teve-se uma eluição lenta do verapamil, com tempos de retenção elevados para os enantiômeros *S*-(-) (34 min) e *R*-(+) (42 min), inviabilizando o processo de separação. Portanto, foi selecionada a fase móvel constituída por 90 % (em volume) de *n*-hexano, 10 % (em volume) de isopropanol e 0,1 % (em volume) de dietilamina, cujos valores dos parâmetros cromatográficos apresentaram-se satisfatórios.

Visando aumentar os valores desses parâmetros (principalmente a resolução) e, conseqüentemente, melhorar a separação, realizaram-se experimentos de *screening* para fases móveis ternárias. As fases móveis foram preparadas misturando-se os alcoóis (isopropanol e etanol) e mantendo-se constantes as proporções de *n*-hexano (90 %, em volume) e dietilamina (0,1 % em volume). Os experimentos foram realizados nas mesmas condições daqueles conduzidos para fases móveis binárias.

Os resultados (Figuras 30 e 31) mostraram claramente que a mistura constituída pelos solventes *n*-hexano, isopropanol, etanol e o aditivo dietilamina nas proporções de 90, 5, 5 e 0,1 % (em volume), respectivamente, apresentaram os maiores valores de resolução, fatores de retenção e seletividade e, portanto, essa mistura foi eleita a fase móvel a ser utilizada no trabalho de pesquisa para estudos de separação dos enantiômeros do fármaco verapamil.

Os parâmetros cromatográficos, obtidos a partir da fase móvel eleita, apresentaram valores que comprovam separações satisfatórias do verapamil. A resolução obtida foi de 1,68 cujo valor, segundo Collins *et al.*, (2006), garante a separação completa dos picos cromatográficos. Quanto aos demais parâmetros, foram obtidos fatores de retenção de 2,98 e 3,98 para os enantiômeros *S*-(-) e *R*-(+), respectivamente e seletividade igual a 1,34. Os resultados destes parâmetros se enquadram dentro da faixa de “bons valores de separação”, estabelecida pela farmacopéia americana (ROSA, 2005).

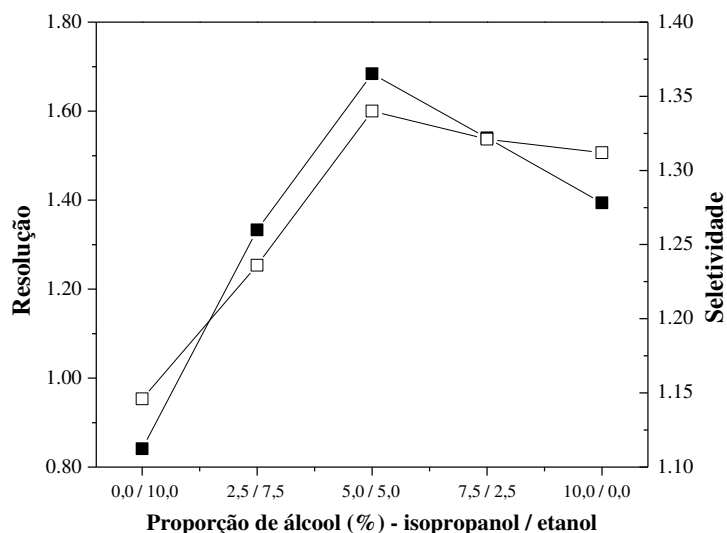


Figura 30. Resolução (■) e seletividade (□) em função da variação da proporção alcoólica da mistura. As proporções de *n*-hexano e dietilamina foram fixadas a 90 % (em volume) e 0,1 % (em volume), respectivamente.

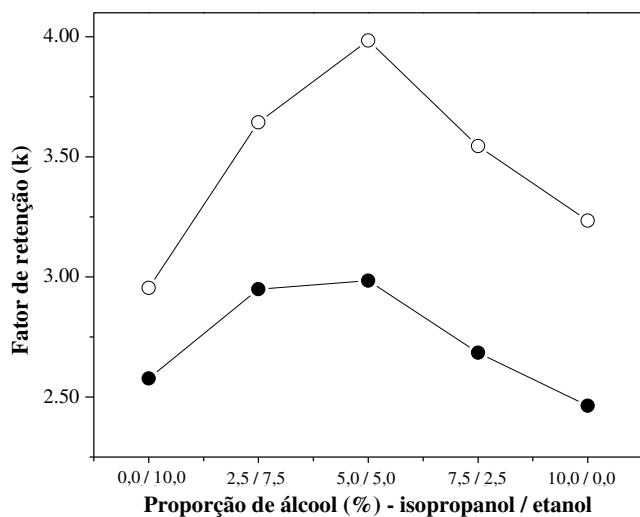


Figura 31. Fatores de retenção dos enantiômeros de verapamil em função da variação da proporção alcoólica da mistura. (●) fator de retenção do *S*-(-)-verapamil; (○) fator de retenção do *R*-(+)-verapamil. As proporções de *n*-hexano e dietilamina foram fixadas a 90 % e 0,1 % (em volume), respectivamente.

4.1.2. Avaliação da queda de pressão na coluna cromatográfica quiral

Os experimentos realizados no sistema CLAE a diferentes vazões forneceram resultados de pressão, cujos dados possibilitaram obter uma relação linear entre a queda de pressão ($\Delta P/L$) e a velocidade intersticial (u) da fase móvel, conforme apresentado na Figura 32. Foi observado que a equação de Kozeny-Carman (Equação 33) descreveu satisfatoriamente os resultados experimentais obtidos ($r^2 = 0,99015$). A permeabilidade do leito cromatográfico (κ) foi indiretamente determinada pela inclinação da reta, apresentando valor igual a $9,55 \times 10^{-10} \text{ cm}^2$. A viscosidade da fase móvel (mistura ternária) foi calculada a partir da correlação proposta por Grunberg e Nissan (1949) (REID *et al.*, 1987) (Apêndice C).

A Tabela 5 apresenta os dados de pressão para a coluna semi-preparativa Chiralpak® AD (10 x 100 mm; 20 μm) para vazão de fase móvel de 1,0 mL min⁻¹ a 6,0 mL min⁻¹.

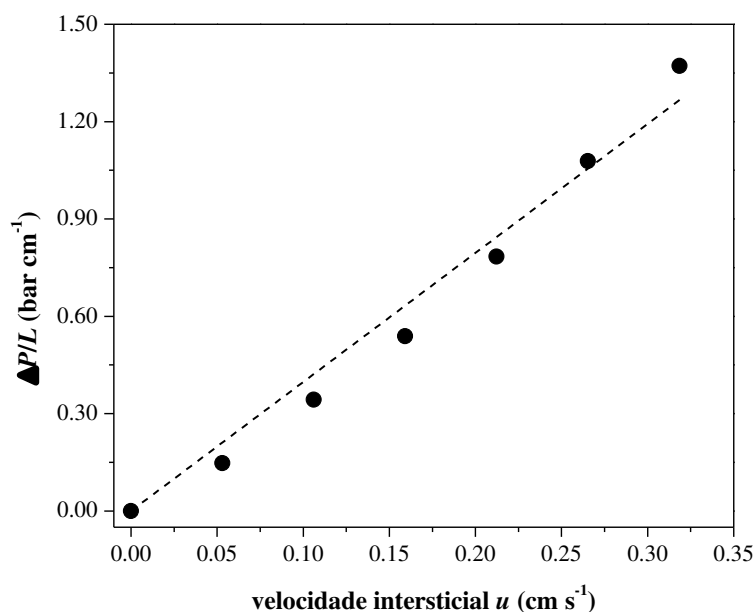


Figura 32. Avaliação da queda de pressão na coluna cromatográfica Chiralpak® AD (100 x 10 mm; 20 μm).

Tabela 5. Dados de pressão para a coluna semi-preparativa Chiralpak® AD

Vazão (mL min ⁻¹)	Pressão da coluna (bar)
1,0	1,47
2,0	3,43
3,0	5,39
4,0	7,84
5,0	10,78
6,0	13,72

Notam-se reduzidas pressões obtidas com a coluna, utilizando a fase móvel *n*-hexano: isopropanol: etanol: dietilamina (90:5:5:0,1 %, em volume). A pressão reduzida na coluna para a vazão de 6,0 mL min⁻¹ mostra a possibilidade da separação dos enantiômeros de verapamil em escala semi-preparativa empregando elevadas vazões de fase móvel.

4.2. EXPERIMENTOS COM SOLUÇÕES DILUÍDAS

4.2.1. Determinação das porosidades total, do leito e das partículas

Experimentos de pulsos cromatográficos com compostos inertes são úteis para a estimativa do volume de vazios na coluna e, consequentemente, para a determinação das porosidades total (ϵ_T), das partículas (ϵ_p) e do leito recheado (ϵ).

Neste trabalho, ϵ_T e ϵ da coluna Chiralpak® AD (100 x 10 mm, 20 μ m) foram determinados a partir de experimentos de pulsos cromatográficos com TTBB e poliestireno, respectivamente, através do método dos momentos (Equação 34).

Os tempos de retenção dos compostos inertes permitiram a construção das curvas do primeiro momento, cujas inclinações forneceram, diretamente, os valores das porosidades total (Figura 33) e do leito (Figura 34). Tendo-se ambas as porosidades, foi possível determinar a porosidade das partículas pela Equação (35). Os valores estão dispostos na Tabela 6.

Tabela 6. Valores das porosidades total, do leito e das partículas obtidos para a coluna Chiralpak® AD (100 x 10 mm; 20 µm)

Porosidade	Valor experimental
<i>Total</i> (ε_T)	$0,68 \pm 0,02$
<i>Leito</i> (ε)	$0,40 \pm 0,01$
<i>Partícula</i> (ε_p)	$0,47 \pm 0,01$

Diversos são os trabalhos na literatura que reportam valores de porosidade total de colunas Chiralpak® AD (100 x 10 mm; 20 µm) utilizando o composto inerte TTBB como traçador. A exemplo, citam-se os trabalhos de Mihlbachler *et al.* (2006) e Zebka e Rodrigues (2007), cujas porosidades obtidas foram de 0,648 e 0,610, respectivamente. Nota-se que os valores reportados diferem daquele obtido no presente trabalho. A diferença deve-se às características da fase estacionária que, mesmo sendo similar, pode apresentar variações quanto ao tamanho dos poros das partículas que a constitui e, principalmente, às condições distintas sob as quais as colunas são recheadas (LAO; GAN, 2008; SILVA JÚNIOR, 2010). Vale ressaltar que Silva Jr. *et al.* (2012) obtiveram valor de porosidade total igual ao obtido neste trabalho, utilizando a mesma coluna quiral com condições idênticas de recheio.

Na literatura, não há relatos a respeito da determinação da porosidade do leito de colunas recheadas com fases estacionárias quirais de polissacarídeos (amilose e celulose), o que confere, ao presente trabalho, a originalidade do valor obtido. Muitos autores utilizam a correlação proposta por Ruthven (1984):

$$\varepsilon_T = 0,45 + 0,55 \varepsilon \quad (38)$$

em que se assume um valor genérico de 0,45 para a porosidade da partícula.

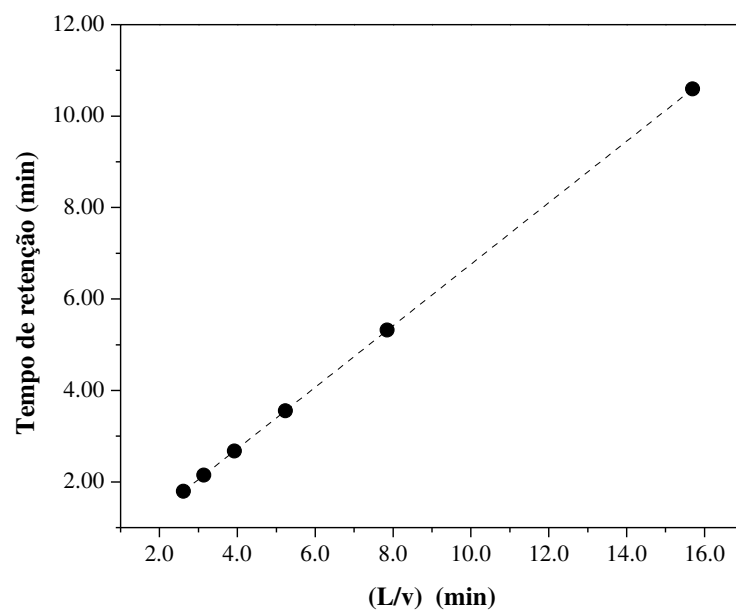


Figura 33. Primeiro momento para o composto inerte TTBB: determinação da porosidade total da coluna cromatográfica ($r^2 = 0,99999$).

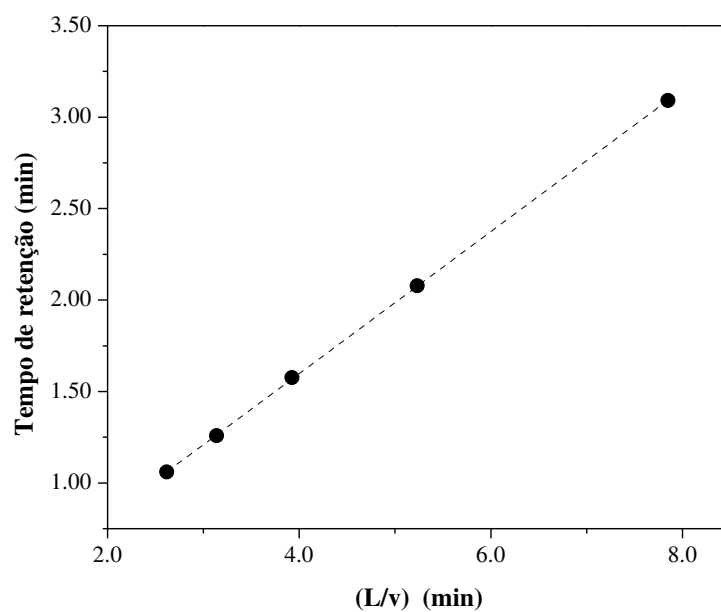


Figura 34. Primeiro momento para o composto inerte poliestireno: determinação da porosidade do leito ($r^2 = 0,99995$).

4.2.2. Determinação dos perfis de eluição e dos parâmetros cromatográficos de separação dos enantiômeros de verapamil em coluna Chiralpak® AD

A Figura 35 apresenta os perfis de eluição do composto inerte TTBB e dos enantiômeros do verapamil. Os experimentos foram realizados em triplicata com vazão da fase móvel igual a $1,0 \text{ mL min}^{-1}$ e temperatura de 25°C .

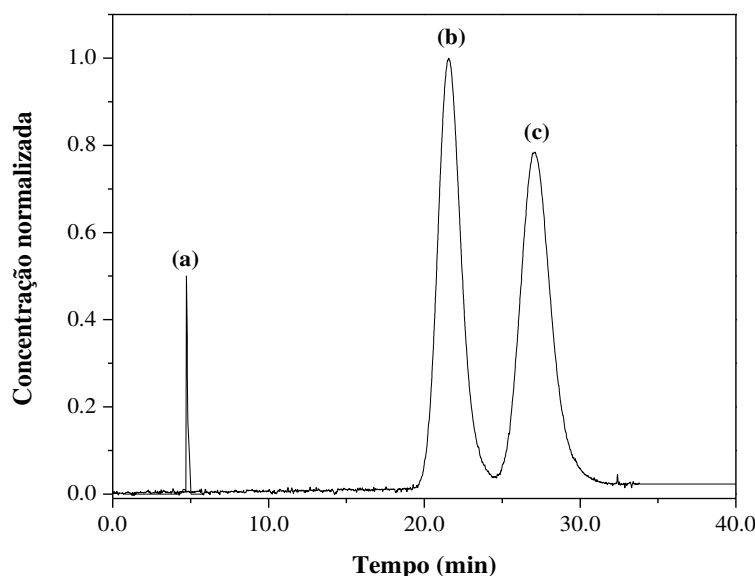


Figura 35. Perfil de eluição do composto inerte (a) TTBB e dos enantiômeros (b) *S*-(-)-verapamil e (c) *R*-(+)-verapamil. Condições experimentais: concentração racêmica, $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$; fase móvel, *n*-hexano: isopropanol: etanol: dietilamina (90: 5: 5: 0,1 %, v/v/v/v); fase estacionária, tris (3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose; vazão, $1,0 \text{ mL min}^{-1}$; detecção, 270 nm; temperatura, 25°C ; volume de injeção, $20 \mu\text{L}$.

Nota-se que o pico de eluição do TTBB possui pequena largura de base e tempo de retenção relativamente curto. Esse é um comportamento esperado, pois o TTBB, por ser um composto inerte, não sofre interação estereosseletiva com a fase estacionária quiral e as resistências à transferência de massa são desprezíveis, o que reduz seu tempo de residência na coluna e o alargamento do pico cromatográfico.

Quanto ao perfil de eluição da mistura racêmica de verapamil, pode-se observar a separação dos seus enantiômeros ocorrendo, praticamente, até a linha de base do cromatograma. As diferentes interações enantiosseletivas existentes entre os enantiômeros do fármaco e a fase estacionária resultam em mecanismos de retenção que promovem a separação quiral. Também se observa um maior alargamento dos picos de eluição dos enantiômeros quando comparados ao do composto inerte, devido aos diferentes processos de transferência de massa que ocorrem externa e internamente às partículas da fase estacionária quiral.

A Figura 36 apresenta os perfis de eluição dos enantiômeros de verapamil a 15, 20, 25, 30 e 35 °C para a vazão de 1,0 mL min⁻¹. Observa-se que, com o aumento da temperatura, há uma diminuição nos tempos de retenção e a separação continua ocorrendo, praticamente, até a linha de base. Entretanto, vale ressaltar a existência de um menor alargamento dos picos de eluição e uma ligeira aproximação entre os mesmos para temperaturas mais elevadas.

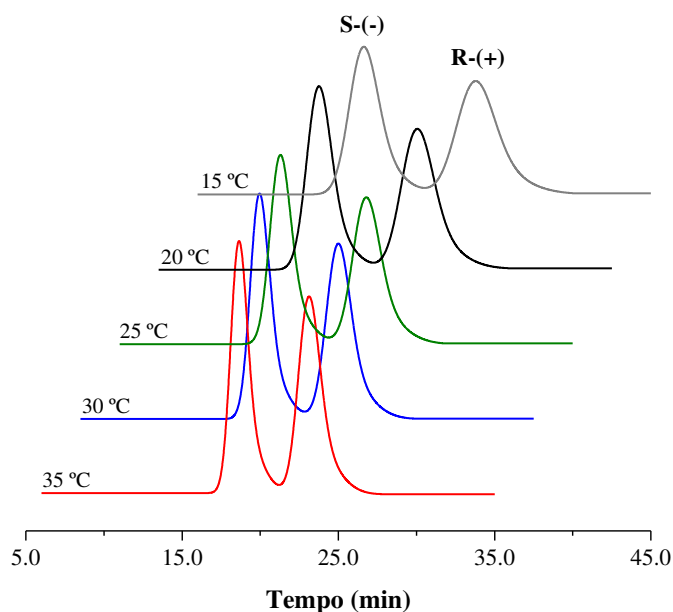


Figura 36. Perfis de eluição dos enantiômeros *S*-(-)-verapamil e *R*-(+)-verapamil em diferentes temperaturas. Condições experimentais: concentração racêmica, 0,5 mg mL⁻¹; fase móvel, *n*-hexano: isopropanol: etanol: dietilamina (90: 5: 5: 0,1 %, v/v/v/v); fase estacionária, tris (3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose; vazão, 1,0 mL min⁻¹; detecção, 270 nm; volume de injeção, 20 µL.

A Figura 37 ilustra os efeitos da temperatura nos tempos de retenção para ambos os enantiômeros de verapamil em diferentes vazões de fase móvel. Verifica-se que, com o aumento da temperatura, há uma diminuição dos tempos de retenção para todas as vazões avaliadas. Temperaturas elevadas promovem a redução da viscosidade da fase móvel o que pode aumentar a velocidade de interação dos enantiômeros com a fase estacionária quiral (DIAS, 2007).

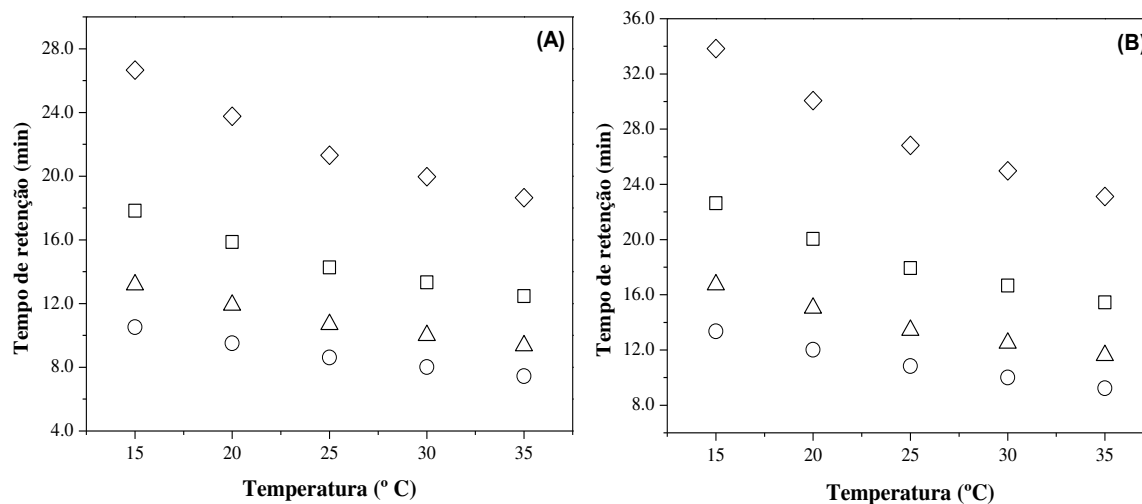


Figura 37. Variações do tempo de retenção dos enantiômeros (A) *S*-(-)-verapamil e (B) *R*-(+)-verapamil em função da temperatura para diferentes vazões de fase móvel. (◇) 1,0 mL min⁻¹; (□) 1,5 mL min⁻¹; (Δ) 2,0 mL min⁻¹; e (○) 2,5 mL min⁻¹.

A Tabela 7 apresenta os parâmetros cromatográficos de separação para os enantiômeros de verapamil em coluna Chiralpak® AD para vazão e temperatura distintas empregadas nos experimentos de pulso cromatográfico.

Tomando-se como referência o fator de retenção (*k*), pode ser observado que todos os valores desse parâmetro, para ambos os enantiômeros, foram maiores que 2,0 e menores que 6,0 dentro da faixa de vazão e temperatura estudadas, enquadrando-se, portanto, na faixa de valores considerados ideais para separações enantioméricas. Segundo Collins *et al.* (2006), esta faixa se estende de 1 a 10. De acordo com a Farmacopéia Americana, conforme reportado por Rosa (2005), os valores devem estar compreendidos entre 1 a 8 de modo que, para se garantir

interações satisfatórias entre os enantiômeros e a fase estacionária, o valor de k deve estar entre 2 e 4.

Quanto ao parâmetro seletividade (α), foram obtidos valores praticamente constantes de 1,34 para as diferentes vazões e temperaturas avaliadas. Okamoto e Kaida (1994) reportaram que, em muitos casos de separações cromatográficas com fases estacionárias quirais baseadas em polissacarídeos, a completa separação será apenas alcançada se α for maior que 1,20. O mesmo valor é adotado pela Farmacopéia Americana, classificando a separação como satisfatória (ROSA, 2005).

São encontrados na literatura alguns estudos de separação dos enantiômeros de verapamil em que se reportam valores de seletividade obtidos, utilizando colunas analíticas Chiralpak® AD. A exemplo, citam-se os trabalhos de Shibukawa e Wainer (1992), que obtiveram valor de α igual a 1,24 utilizando-se, como fase móvel, uma mistura de *n*-hexano: isopropanol: etanol: trietilamina (85: 7,5: 7,5: 0,1 %, v/v/v/v) e vazão de 1,5 mL min⁻¹; além do trabalho de Fieger e Blaschke (1992), cujo valor encontrado foi de 1,29, em que se utilizou fase móvel *n*-hexano: isopropanol: dietilamina (90: 10: 0,1 %, v/v/v) com vazão de 1,0 mL min⁻¹.

Outro parâmetro importante a ser determinado foi a resolução (R_s) que, de forma geral, relaciona os tempos de retenção e largura de base dos picos de eluição e fornece informações suficientes para se avaliar a qualidade da separação.

A Figura 38 apresenta os valores deste parâmetro cromatográfico avaliado nas diferentes vazões e temperaturas. Nota-se que, para cada temperatura estudada, o aumento da vazão da fase móvel acarretou na diminuição do valor de R_s . Quando o sistema é submetido a vazões elevadas, o tempo de residência dos enantiômeros no interior do leito cromatográfico se reduz e, conseqüentemente, ocorre menor tempo de interação entre as moléculas e a fase estacionária, comprometendo a eficiência da separação quiral (SARTOR, 2006). Nota-se também que, os valores de R_s aumentam com o aumento da temperatura, visto que ocorre uma aproximação entre os picos cromatográficos devido a redução de suas respectivas larguras de base.

Pode-se observar ainda na Figura 38 que os maiores valores de resolução foram alcançados para a menor vazão estudada (1,0 mL min⁻¹), com destaque para a temperatura de 35 °C, cujo valor obtido foi de $1,74 \pm 0,03$. Contudo, como o ganho de resolução foi pequeno quando se variou a temperatura do sistema em 10 °C e visando reduzir o consumo de energia do

Tabela 7. Parâmetros cromatográficos de separação do verapamil na coluna quiral Chiralpak® AD (10 x 100 mm; 20 µm) a diferentes vazões e temperaturas

Temperatura de 15 °C			
Vazão (mL/min)	k_{S-(-)-verapamil}	k_{R-(+)-verapamil}	α (seletividade)
1,0	4,00 ± 0,01	5,35 ± 0,01	1,34 ± 0,01
1,5	3,98 ± 0,07	5,32 ± 0,05	1,34 ± 0,01
2,0	3,89 ± 0,02	5,21 ± 0,07	1,34 ± 0,04
2,5	3,88 ± 0,02	5,20 ± 0,03	1,34 ± 0,01
Temperatura de 20 °C			
Vazão (mL/min)	k_{S-(-)-verapamil}	k_{R-(+)-verapamil}	α (seletividade)
1,0	3,46 ± 0,01	4,64 ± 0,02	1,34 ± 0,01
1,5	3,47 ± 0,01	4,65 ± 0,01	1,34 ± 0,01
2,0	3,49 ± 0,06	4,67 ± 0,03	1,34 ± 0,02
2,5	3,45 ± 0,03	4,63 ± 0,04	1,34 ± 0,01
Temperatura de 25 °C			
Vazão (mL/min)	k_{S-(-)-verapamil}	k_{R-(+)-verapamil}	α (seletividade)
1,0	3,05 ± 0,08	4,10 ± 0,01	1,34 ± 0,01
1,5	3,04 ± 0,03	4,08 ± 0,05	1,34 ± 0,01
2,0	3,03 ± 0,02	4,07 ± 0,01	1,34 ± 0,01
2,5	3,05 ± 0,06	4,09 ± 0,02	1,34 ± 0,02
Temperatura de 30 °C			
Vazão (mL/min)	k_{S-(-)-verapamil}	k_{R-(+)-verapamil}	α (seletividade)
1,0	2,80 ± 0,03	3,75 ± 0,04	1,34 ± 0,03
1,5	2,80 ± 0,01	3,75 ± 0,01	1,34 ± 0,01
2,0	2,79 ± 0,02	3,74 ± 0,02	1,34 ± 0,01
2,5	2,80 ± 0,03	3,74 ± 0,07	1,34 ± 0,02
Temperatura de 35 °C			
Vazão (mL/min)	k_{S-(-)-verapamil}	k_{R-(+)-verapamil}	α (seletividade)
1,0	2,57 ± 0,01	3,43 ± 0,03	1,33 ± 0,01
1,5	2,56 ± 0,01	3,42 ± 0,01	1,33 ± 0,01
2,0	2,56 ± 0,01	3,41 ± 0,01	1,33 ± 0,04
2,5	2,55 ± 0,02	3,39 ± 0,02	1,33 ± 0,03

sistema cromatográfico, optou-se em conduzir o processo de separação a 25 °C, em que o valor de resolução obtido foi de $1,70 \pm 0,02$. Ressalta-se que, separações cromatográficas completas por linha de base são atingidas quando valores de resolução são iguais ou superiores a 1,50 (COLLINS *et al.*, 2006).

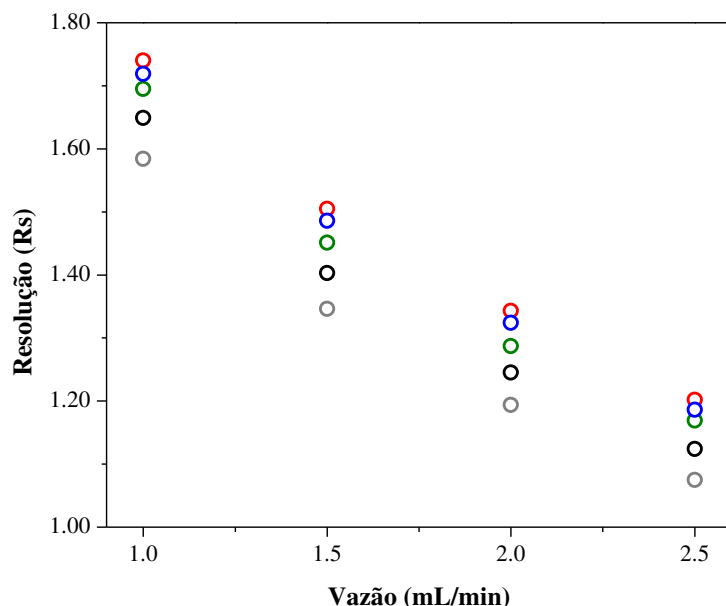


Figura 38. Efeito da vazão e da temperatura na resolução dos enantiômeros de verapamil. *Legenda:* 15 °C (cinza); 20 °C (preto); 25 °C (verde); 30 °C (azul); 35 °C (vermelho). *Condições experimentais:* concentração racêmica, 0,5 mg mL⁻¹; fase móvel, *n*-hexano: isopropanol: etanol: dietilamina (90: 5: 5: 0,1 %, v/v/v/v); fase estacionária, tris (3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose; vazão, 1,0 mL min⁻¹; detecção, 270 nm; volume de injeção, 20 µL.

4.2.3. Determinação das constantes de equilíbrio de adsorção: constantes de Henry

De acordo com as retas obtidas a diferentes temperaturas (Figuras 39 e 40), pela análise do primeiro momento para os enantiômeros do verapamil, foi possível determinar as constantes de equilíbrio de adsorção (K_p) pelas inclinações das retas entre os tempos de retenção (t_R) e a relação (L/u), conforme Equação (8). Essas constantes, quando obtidas para soluções diluídas,

correspondem às constantes de Henry (He), cujos efeitos competitivos são considerados desprezíveis.

Pode-se observar nas Figuras 39 e 40 que as retas ajustaram-se satisfatoriamente aos pontos experimentais. Os valores das inclinações (ψ) com seus respectivos coeficientes de determinação (r^2) e das constantes de equilíbrio de adsorção (constantes de Henry), obtidos para as diferentes temperaturas, estão dispostos na Tabela 8.

Os resultados apresentados (Tabela 8) mostram que as constantes de Henry (He) estão diretamente associadas aos efeitos termodinâmicos, pois seus valores diferem para cada enantiômero em cada temperatura avaliada. Isto indica, seguramente, que a temperatura influencia a adsorção dos enantiômeros do verapamil na fase estacionária Chiralpak® AD, no qual o seu aumento provoca decréscimos dos valores de He , mostrando, de fato, que o fenômeno de adsorção é exotérmico (RUTHVEN, 1984).

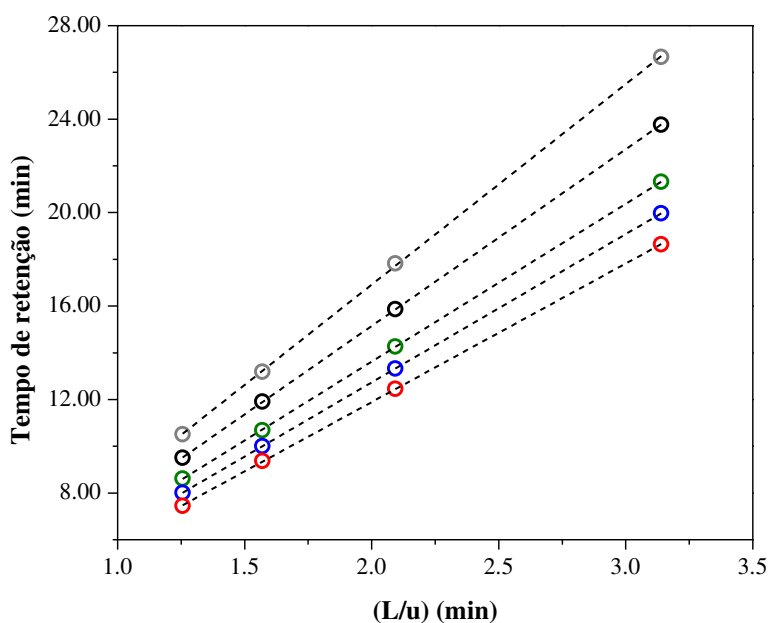


Figura 39. Aplicação do método do primeiro momento para a determinação das constantes de equilíbrio de adsorção para o enantiômero *S-(-)-verapamil* nas temperaturas de 15 °C (cinza), 20 °C (preto), 25 °C (verde), 30 °C (azul) e 35 °C (vermelho).

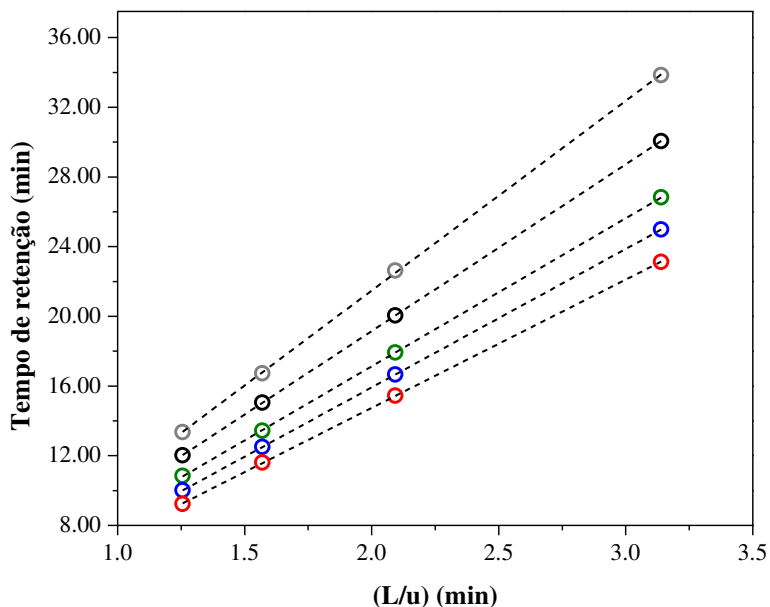


Figura 40. Aplicação do método do primeiro momento para a determinação das constantes de equilíbrio de adsorção para o enantiômero *R*-(+)-*verapamil* nas temperaturas de 15 °C (cinza), 20 °C (preto), 25 °C (verde), 30 °C (azul) e 35 °C (vermelho).

Tabela 8. Valores das constantes de equilíbrio de adsorção (constantes de Henry, *He*) para os enantiômeros do verapamil em diferentes temperaturas

Temperatura (°C)	Enantiômero					
	<i>S</i> -(-)- <i>verapamil</i>			<i>R</i> -(+)- <i>verapamil</i>		
	(ψ)	(r^2)	(<i>He</i>)	(ψ)	(r^2)	(<i>He</i>)
15	8,58	0,999	8,65 ± 0,06	10,89	0,999	11,55 ± 0,06
20	7,56	0,999	7,37 ± 0,02	9,57	0,999	9,89 ± 0,01
25	6,75	0,999	6,35 ± 0,02	8,50	0,999	8,56 ± 0,03
30	6,35	0,999	5,84 ± 0,01	7,95	0,999	7,85 ± 0,01
35	5,93	0,999	5,32 ± 0,01	7,36	0,999	7,12 ± 0,01

Observa-se que a fase estacionária apresentou maior afinidade pelo enantiômero *R*-(+)-*verapamil*, cujos valores de *He* foram superiores aos do seu antípoda *S*-(-)-*verapamil*. A baixas temperaturas, a força de interação entre os enantiômeros e o adsorvente torna-se mais expressiva, o que se comprova pelos maiores valores de *He* obtidos experimentalmente. O aumento da constante de Henry a temperaturas mais baixas pode significar uma importante contribuição para o alargamento das bandas dos picos cromatográficos devido a uma redução da cinética de dessorção entre os enantiômeros e a fase estacionária quiral (SILVA JUNIOR, 2003).

Por outro lado, para temperaturas elevadas, notou-se uma redução dos valores de *He*. O aumento da temperatura, além de diminuir a viscosidade da fase móvel, reduz a interação dos enantiômeros com a fase estacionária, levando a uma diminuição dos tempos de retenção das moléculas quirais e consequente diminuição da constante de equilíbrio de adsorção (SARTOR, 2006; FREITAS, 2009).

Ressalta-se ainda que as constantes de Henry são parâmetros fundamentais para o projeto das condições de operação de uma unidade de leito móvel quando se utilizam métodos baseados na teoria do equilíbrio (Método do Triângulo), conforme reportado por Mazzotti *et al.*, (1997).

4.2.4. Eficiência de separação e parâmetros de transferência de massa

A eficiência da separação dos enantiômeros do verapamil em coluna Chiralpak® AD foi avaliada através da análise dos valores de *HETP*, determinados a partir do número de pratos (*Np*), pela Equação (12). Na Tabela 9 são apresentados os valores de *Np* em diferentes temperaturas e vazões de fase móvel.

Os altos valores de *Np* alcançados revelam uma eficiência satisfatória de separação dos enantiômeros na coluna, cujo desempenho apresentou-se maior ($Np > 1000$) para baixa vazão ($1,0 \text{ mL min}^{-1}$) e elevada temperatura (35°C). Conforme reportado por Snyder e Kirkland (1979), valores de *Np* elevados são obtidos, geralmente, em colunas recheadas com partículas relativamente pequenas sob baixa vazão de fase móvel e altas temperaturas de separação.

Analisando-se a Tabela 9, pode-se observar um aumento nos valores de *Np* com a elevação da temperatura a uma vazão constante. No entanto, estes valores decrescem quando a temperatura é mantida constante e a vazão varia de $1,0$ a $2,5 \text{ mL min}^{-1}$. O aumento de *Np* deve-se,

principalmente, à redução acentuada na largura das bases dos picos de eluição (Figura 36), ao passo que, seu decréscimo está associado à diminuição dos tempos de retenção dos enantiômeros.

Tabela 9. Número de pratos em diferentes temperaturas e vazões de fase móvel para os enantiômeros do verapamil

<i>Vazão</i> (mL/min)	<i>T</i> (°C)	<i>Np</i> <i>S</i> -(-)	<i>Np</i> <i>R</i> -(+)	<i>Vazão</i> (mL/min)	<i>T</i> (°C)	<i>Np</i> <i>S</i> -(-)	<i>Np</i> <i>R</i> -(+)
1,0	15	738 ± 3	694 ± 5	2,0	15	430 ± 7	388 ± 2
	20	829 ± 2	771 ± 1		20	482 ± 3	437 ± 1
	25	910 ± 4	857 ± 4		25	539 ± 1	490 ± 1
	30	969 ± 5	935 ± 7		30	597 ± 1	549 ± 2
	35	1093 ± 1	1018 ± 3		35	664 ± 2	603 ± 1
1,5	15	535 ± 2	498 ± 1	2,5	15	346 ± 1	310 ± 1
	20	604 ± 1	560 ± 1		20	393 ± 1	355 ± 1
	25	679 ± 1	626 ± 2		25	446 ± 2	403 ± 1
	30	753 ± 1	690 ± 3		30	483 ± 3	439 ± 1
	35	826 ± 1	758 ± 2		35	537 ± 1	489 ± 7

A partir dos valores expostos na Tabela 9, a Equação (12) foi utilizada para o cálculo dos valores de *HETP*. As Figuras 41 e 42 (gráficos de van Deemter) mostram a dependência de *HETP* com a velocidade intersticial (*u*) de escoamento da fase móvel para os enantiômeros *S*-(-)- e *R*-(+)-*verapamil*, respectivamente. Para a faixa de vazão utilizada, obtiveram-se relações lineares entre *HETP* e *u* e não foi verificado o ponto de inflexão mínimo para ambos os enantiômeros, conforme apresentado na Figura 9. Para isso, seriam necessárias vazões mais baixas de fase móvel.

Portanto, a inexistência de um valor mínimo nos gráficos de *HETP* versus *u* indica que o coeficiente *B* da equação de van Deemter, o qual está relacionado aos efeitos de difusão molecular, pode ser desprezado na faixa de vazão estudada, e a eficiência da coluna é influenciada apenas pelos efeitos de dispersão axial (coeficiente *A*) e de transferência de massa (coeficiente *C*).

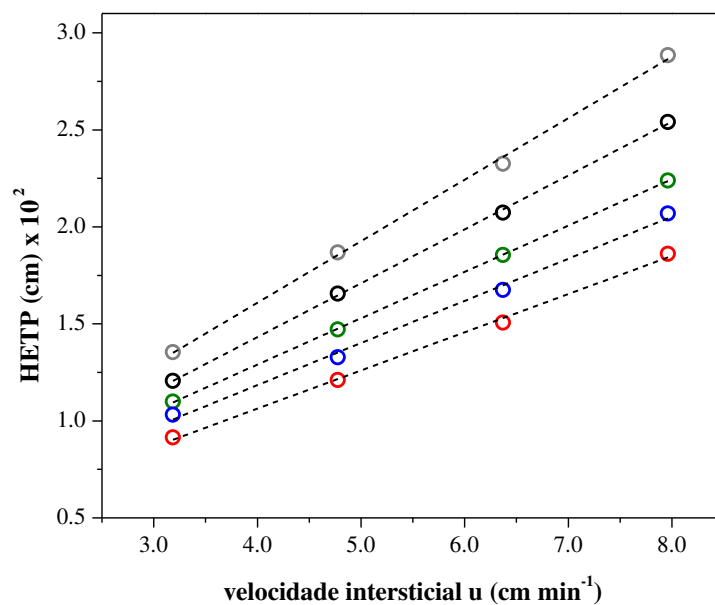


Figura 41. Gráfico de van Deemter para o enantiômero *S*-(-)-verapamil nas temperaturas de 15 °C (cinza), 20 °C (preto), 25 °C (verde), 30 °C (azul) e 35 °C (vermelho).

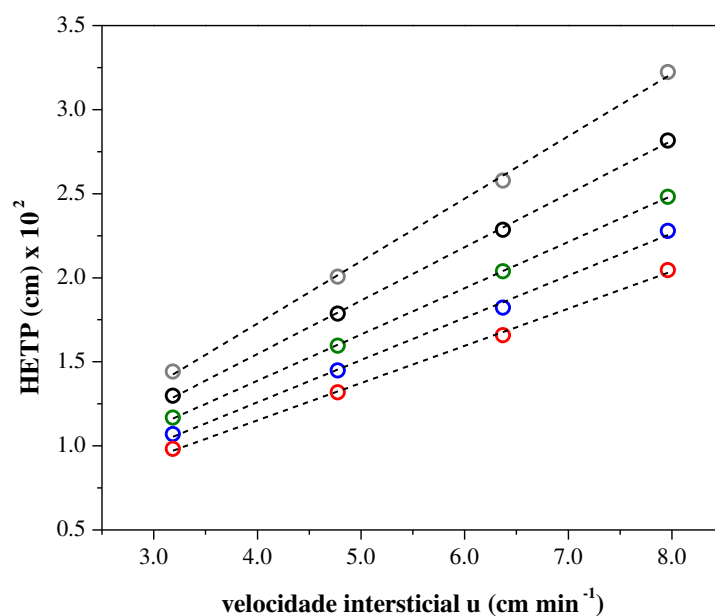


Figura 42. Gráfico de van Deemter para o enantiômero *R*-(+)-verapamil nas temperaturas de 15 °C (cinza), 20 °C (preto), 25 °C (verde), 30 °C (azul) e 35 °C (vermelho).

Os coeficientes lineares e angulares das retas apresentadas nas Figuras 40 e 41 correspondem aos coeficientes A e C da equação modificada de van Deemter (Equação 15), respectivamente. Seus valores para ambos os enantiômeros em temperaturas distintas, juntamente com seus respectivos coeficientes de determinação (r^2), estão dispostos na Tabela 10.

A partir desses resultados, foi possível determinar os valores dos coeficientes de dispersão axial (D_L/u) e de transferência de massa global (k_m) para os enantiômeros do verapamil, conforme mostrado na Tabela 11.

Tabela 10. Coeficientes A e C da equação modificada de van Deemter para os enantiômeros do verapamil

T (°C)	<i>S</i> -(<i>-</i>)-verapamil			<i>R</i> -(<i>+</i>)-verapamil		
	$A \times 10^3$ (cm)	$C \times 10^3$ (cm)	r^2	$A \times 10^3$ (cm)	$C \times 10^3$ (cm)	r^2
15	3,41 ± 0,50	3,17 ± 0,08	0,99785	2,42 ± 0,51	3,71 ± 0,09	0,99833
20	3,21 ± 0,24	2,78 ± 0,04	0,99937	2,77 ± 0,25	3,17 ± 0,04	0,99947
25	3,35 ± 0,06	2,39 ± 0,01	0,99993	2,87 ± 0,09	2,75 ± 0,01	0,99991
30	3,16 ± 0,58	2,17 ± 0,10	0,99388	2,54 ± 0,51	2,51 ± 0,09	0,99645
35	2,76 ± 0,38	1,97 ± 0,06	0,99683	2,66 ± 0,31	2,21 ± 0,05	0,99826

Tabela 11. Coeficientes de dispersão axial e de transferência de massa global para os enantiômeros do verapamil

T (°C)	$(D_L/u) \times 10^3$ (cm)		k_m (min ⁻¹)	
	<i>S</i> -(<i>-</i>)	<i>R</i> -(<i>+</i>)	<i>S</i> -(<i>-</i>)	<i>R</i> -(<i>+</i>)
15	1,71 ± 0,08	1,19 ± 0,09	65,70 ± 0,88	45,32 ± 0,34
20	1,61 ± 0,08	1,39 ± 0,01	82,47 ± 1,26	58,96 ± 0,07
25	1,68 ± 0,01	1,44 ± 0,01	104,95 ± 0,62	74,38 ± 0,95
30	1,59 ± 0,23	1,28 ± 0,07	122,11 ± 3,18	87,51 ± 0,49
35	1,38 ± 0,02	1,34 ± 0,14	142,10 ± 1,02	105,89 ± 3,04

Como as moléculas quirais apresentam propriedades físico-químicas idênticas e a dispersão axial em separações enantioméricas é determinada pela vazão e não pela difusão molecular, os valores de tal parâmetro deveriam ser aproximadamente iguais para ambos os enantiômeros (DUAN *et al.*, 1998; WANG; CHING, 2002; FREITAS, 2009). Contudo, observa-se na Tabela 11 uma variação da dispersão axial entre os enantiômeros estudados neste trabalho. Alguns autores atribuem esse comportamento a erros experimentais (DUAN *et al.*, 1998; WANG; CHING, 2002) e à distribuição do tamanho das partículas da fase estacionária quiral empacotada (JACOBSON *et al.*, 1993). Analisando a Tabela 11, pode-se verificar que os valores do parâmetro km apresentaram-se maiores para o enantiômero *S*-(-)-*verapamil* em todas as temperaturas investigadas, quando comparado ao seu antípoda *R*-(+)-*verapamil*. Além disso, os valores de km , para ambos os enantiômeros, aumentaram com a elevação da temperatura. Segundo Silva Jr. (2006), quando se aumenta a temperatura, a resistência à transferência de massa diminui, fato que pode ser explicado pelo decréscimo da viscosidade da fase móvel, aumentando a mobilidade das moléculas quirais no interior dos poros das partículas do leito cromatográfico.

De acordo com a magnitude dos valores de km (Tabela 11), pode-se considerar que a transferência de massa global foi relativamente rápida na coluna Chiralpak® AD para temperaturas mais elevadas. No entanto, para baixas temperaturas, foram obtidos valores relativamente menores para o coeficiente. Segundo Miyabe e Guiochon (1999), a baixa cinética de transferência de massa é a principal contribuição para o alargamento das bandas dos picos de eluição. De fato, os perfis de eluição do verapamil racêmico, para as menores temperaturas avaliadas (Figura 36), apresentaram considerável alargamento das bandas, principalmente para o enantiômero mais retido, *R*-(+)-*verapamil*, em que se encontraram os menores valores de km .

4.2.5. Análise termodinâmica de adsorção

Os parâmetros termodinâmicos de adsorção para os enantiômeros do verapamil foram determinados pelo gráfico de *van't Hoff*, de acordo com as Equações (25) e (26). A inclinação e a intersecção das retas obtidas pela relação linear $\ln k$ versus T^{-1} permitiram calcular os valores dos termos entálpico (ΔH) e entrópico (ΔS), respectivamente; ao passo que, a relação linear

$\ln \alpha$ versus T^{-1} possibilitou o cálculo dos valores das diferenças de entalpia $\Delta(\Delta H)$ e entropia $\Delta(\Delta S)$. As retas, obtidas a partir dos fatores de retenção, para os enantiômeros *S*-(-) e *R*-(+)-*verapamil*, são mostradas na Figura 43, enquanto que a reta, obtida em função dos fatores de separação, está indicada na Figura 44.

Para ambos os enantiômeros, a linearidade de $\ln k$ e $\ln \alpha$ versus T^{-1} mostra que a FEQ não se altera em conformação e que as interações enantiosseletivas envolvidas durante a separação permanecem inalteradas. Quando não ocorre a dependência linear entre $\ln k$ versus T^{-1} , pode-se dizer que a não linearidade desse gráfico é atribuída à presença de múltiplos mecanismos de retenção (WAINER; BOOTH, 1996) e que a superfície da fase estacionária é heterogênea ocorrendo variações conformacionais na fase estacionária com a temperatura (LEHOTAY *et al.*, 2004; ROSA, 2005).

Os valores dos parâmetros termodinâmicos dos enantiômeros do *verapamil*, determinados a partir das inclinações e intersecções das retas obtidas, são apresentados na Tabela 12. Os valores negativos de ΔH são indicativos de que é mais favorável, energeticamente, aos enantiômeros permanecerem na fase estacionária (FRANCOTTE, 2001). O valor mais negativo para o *R*-(+)-*verapamil* favorece uma maior interação com a FEQ e, conseqüentemente, maior tempo de retenção.

A variação de entropia está relacionada às variações de ordem-desordem de um sistema. Quanto mais randômico for o sistema, maior a sua entropia. Portanto, valores negativos de ΔS indicam um aumento na ordem do sistema cromatográfico para cada enantiômero ser transferido da fase móvel para a fase estacionária (GOOSSENS *et al.*, 2004; ROSA, 2005).

Quanto aos parâmetros $\Delta(\Delta H)$ e $\Delta(\Delta S)$, também foram encontrados valores negativos, indicando que a transferência dos enantiômeros das fases móvel para a estacionária e o processo de separação são governados entálpicamente (GOOSSENS *et al.*, 2004).

Finalmente, o valor calculado para a temperatura isoenantiosseletiva (T_{iso}) foi de 790,01 °C (1063,16 K). Conforme relatado na Seção 2.5.4, tal parâmetro define a temperatura na qual os termos entálpicos e entrópicos são balanceados e $\alpha = 1$ [$\Delta(\Delta G) = 0$], ou seja, não há separação.

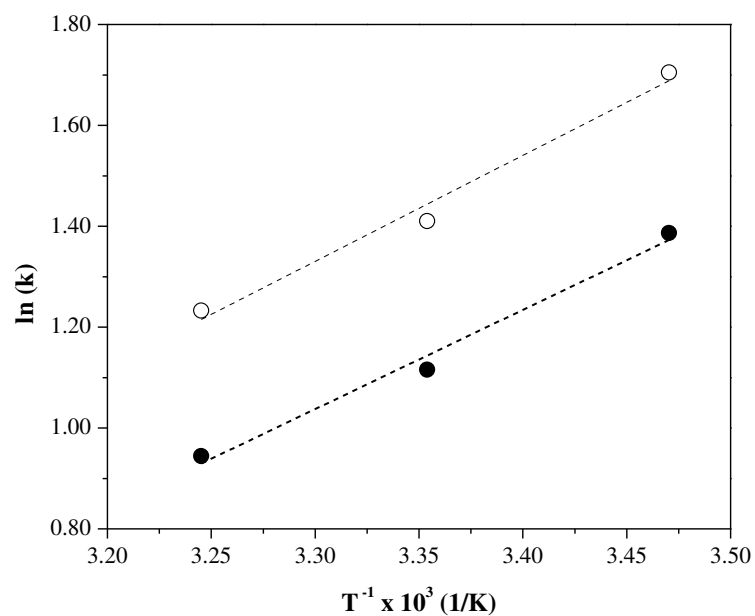


Figura 43. Dependência dos fatores de retenção (k) dos enantiômeros (●) *S*-(-)-verapamil ($r^2 = 0,97603$) e (○) *R*-(+)-verapamil ($r^2 = 0,97024$) com a temperatura. Vazão: $1,0 \text{ mL min}^{-1}$.

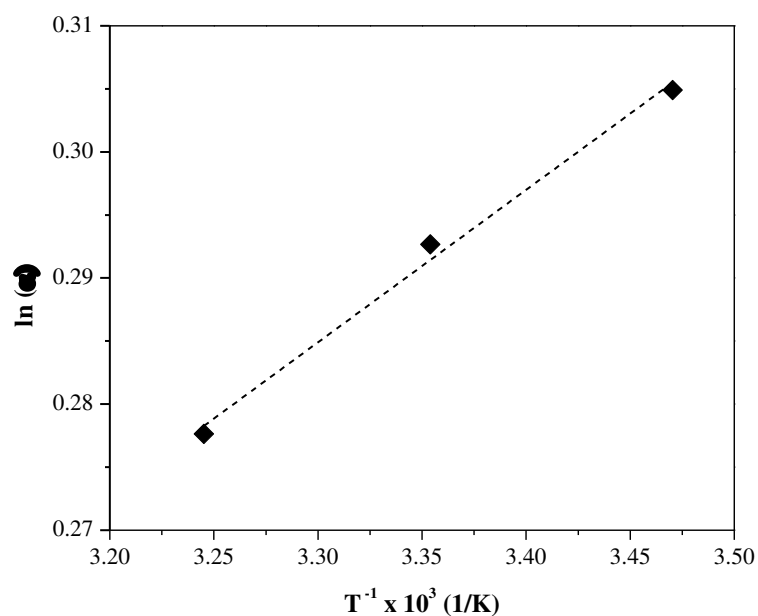


Figura 44. Dependência do fator de separação (α) dos enantiômeros do verapamil com a temperatura ($r^2 = 0,98768$). Vazão: $1,0 \text{ mL min}^{-1}$.

Tabela 12. Parâmetros termodinâmicos da separação dos enantiômeros do verapamil em coluna quiral Chiralpak® AD

Parâmetro termodinâmico	<i>S</i> (-)-verapamil	<i>R</i> (+)-verapamil
$\Delta H^{(a)}$ (kJ.mol ⁻¹)	- 16,36	- 17,48
$\Delta S^{(b)}$ (J.K ⁻¹ .mol ⁻¹)	- 45,39	- 46,64
$\Delta(\Delta H)^{(c)}$ (kJ.mol ⁻¹)		- 1,01
$\Delta(\Delta S)^{(d)}$ (J.K ⁻¹ .mol ⁻¹)		- 0,95
$T_{iso}^{(e)}$ (K)		1063,16

^(a) Parâmetro obtido a partir da inclinação do gráfico $\ln k$ vs. $1/T$; ^(b) Parâmetro obtido a partir da intersecção do gráfico $\ln k$ vs. $1/T$; ^(c) Parâmetro obtido a partir da inclinação do gráfico $\ln \alpha$ vs. $1/T$; ^(d) Parâmetro obtido a partir da intersecção do gráfico $\ln \alpha$ vs. $1/T$; ^(e) Calculado da equação $T_{iso} = \Delta(\Delta H)/\Delta(\Delta S)$.

Para a faixa de temperatura utilizada no presente trabalho, pode-se afirmar que o sistema foi controlado por efeitos entálpicos, pois $T < T_{iso}$. Isso significa seguramente que, a ordem de eluição dos enantiômeros foi mantida em todos os experimentos, não havendo inversão. Acima da T_{iso} , caso fosse possível realizar a separação, o processo seria controlado através da entropia.

4.3. EXPERIMENTOS COM SOLUÇÕES CONCENTRADAS

4.3.1. Perfis de eluição em condições de sobrecarga (*overload*) na coluna Chiralpak® AD

Para o estudo dos perfis de eluição dos enantiômeros do verapamil em condições de sobrecarga (*overload*) na coluna, adotou-se o método em que se emprega a variação do volume de injeção a partir de uma única solução concentrada da mistura racêmica do fármaco, devido a sua elevada solubilidade (110 g L⁻¹) na fase móvel.

Na Figura 45 são apresentados os perfis de eluição para os diferentes volumes de injeção (20, 50, 100, 200, 500, 600 e 800 µL) de uma solução de verapamil racêmico na concentração de 10 g L⁻¹, com vazão da fase móvel de 1,0 mL min⁻¹ e temperatura controlada de 25 °C.

Pode-se notar uma leve redução dos tempos de retenção à medida que ocorre o aumento nos volumes de injeção. Conforme reportado por Guiochon *et al.* (1994), quando se aumenta a massa injetada na coluna, há maior quantidade de moléculas competindo pelos sítios de adsorção disponíveis e a saturação da coluna tende a acontecer mais rapidamente. Seidel-Morgenstern e Guiochon (1993) também explicam que o aumento da massa de soluto leva à diminuição da inclinação das isotermas de adsorção e isto conduz ao decréscimo nos tempos de retenção.

Nota-se que, a largura de base dos picos sofreu uma pequena expansão, cujo efeito refletiu-se no aumento da assimetria dos picos cromatográficos. Observa-se ainda que, para uma massa injetada de 5 mg (volume de injeção igual a 500 μL) a coluna apresentou sinais de saturação, isto é, ocorreu o chamado “toque de bandas” dos picos com a elevação da linha de base entre eles.

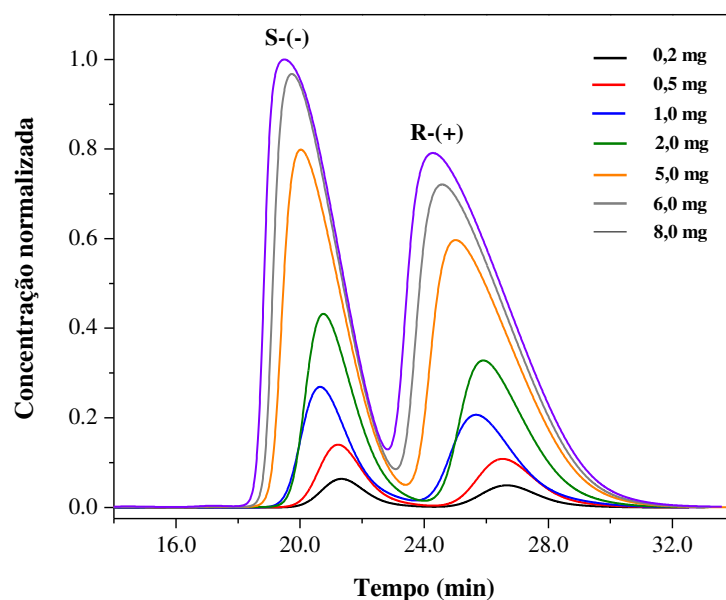


Figura 45. Perfis de eluição do verapamil em condições de sobrecarga na coluna Chiralpak® AD (100 x 10 mm; 20 μm). Volumes de injeção: 20 μL (preto); 50 μL (vermelho); 100 μL (azul); 200 μL (verde); 500 μL (laranja); 600 μL (cinza); e 800 μL (roxo). Fase móvel, *n*-hexano: isopropanol: etanol: dietilamina 90:5:5:0,1 % (v/v/v/v); vazão, 1,0 mL min⁻¹; detecção, 260 nm; temperatura, 25 °C; concentração, 10 g L⁻¹.

Conforme descrito no Capítulo 3 (Seção 3.2.3.1), o estudo dos perfis de eluição sob condições de sobrecarga na coluna torna-se útil à obtenção dos parâmetros das isotermas de adsorção não-linear e de suas respectivas curvas para ambos os enantiômeros. Tomando-se os tempos de retenção à meia altura das frentes dos picos cromatográficos, podem-se estimar os parâmetros da isoterma de adsorção de Langmuir Competitiva Modificada e obter, conseqüentemente, a curva das respectivas isotermas com o auxílio do software *HELP*®.

A Tabela 13 mostra os tempos de retenção à meia altura das frentes dos picos, obtidos experimentalmente, para os enantiômeros do fármaco verapamil.

Tabela 13. Tempos de retenção à meia altura da frente dos picos cromatográficos no estudo de sobrecarga em coluna semi-preparativa Chiralpak® AD

Volume de injeção (μL)	Massa injetada (mg)	Tempo de retenção à meia altura das frentes dos picos (min)	
		<i>S-(-)-verapamil</i>	<i>R-(+)-verapamil</i>
20	0,2	20,69	25,83
50	0,5	20,58	25,67
100	1,0	20,00	24,80
200	2,0	20,15	25,10
500	5,0	19,40	24,17
600	6,0	19,12	23,73
800	8,0	18,83	23,37

Os resultados apresentados indicam que é possível trabalhar em condições de concentrações e volumes de injeção elevados, permitindo obter separações dos enantiômeros em escala preparativa. Vale ressaltar que, em condições de sobrecarga, os perfis de eluição são controlados pela termodinâmica de adsorção e os efeitos de transferência de massa são desprezíveis (GUIOCHON *et al.*, 1994; SEIDEL-MORGENSTERN, 2004).

4.3.2. Isotermas de Adsorção

A partir das curvas de isotermas de adsorção, podem-se obter informações a respeito do equilíbrio que se estabelece para os enantiômeros, entre as fases móvel e estacionária, durante a passagem pelo leito recheado. No presente trabalho, as isotermas de adsorção dos enantiômeros do verapamil foram obtidas através de (i) simulações realizadas pelo *HELP*® (Seção 3.2.3.2) em que se inseriram no software resultados experimentais de pulsos analíticos e de perfis de eluição em condições de sobrecarga da coluna, e através de (ii) experimentos, aplicando-se o método da *análise frontal* para temperatura de 25 °C e vazão de 2,0 mL min⁻¹, conforme apresentado na Seção 3.2.3.2.

4.3.2.1. Isotermas de adsorção simuladas pelo software *HELP*®

A princípio, foram inseridos no software (Figura 46) valores dos parâmetros geométricos da coluna Chiralpak® AD, tais como o diâmetro interno, o comprimento efetivo e o tamanho das partículas e, resultados experimentais de injeções analíticas, isto é, os tempos de retenção dos enantiômeros para vazões de 1,0 mL min⁻¹.

The screenshot displays the HELP 10.3 software interface. At the top, there is a menu bar with 'Files', 'View', and '?'. Below the menu bar, there are three tabs: 'Analytical injection', 'Adsorption isotherm', and 'Hydrodynamics'. The 'Analytical injection' tab is currently selected. The interface is divided into two main sections. The left section, titled 'Column parameters', contains four input fields: 'Column diameter (cm)' with a value of 1.0, 'Column length (cm)' with a value of 10, 'Bed density (kg/L)' with a value of 0.69, and 'Particle size (um)' with a value of 20. The right section, titled 'Analytical injection', contains three input fields: 'Flowrate (mL/min)' with a value of 1, 'Retention time 1 (min)' with a value of 21.321, and 'Retention time 2 (min)' with a value of 26.825.

Figura 46. Dados referentes aos parâmetros geométricos da coluna cromatográfica e resultados experimentais decorrentes da injeção analítica.

Posteriormente, foram introduzidos os resultados de sobrecarga da coluna (Figura 47), voltados aos volumes de injeção (V_{inj}), às concentrações de alimentação dos enantiômeros (C1 e C2) e a seus respectivos tempos de retenção à meia altura das frentes dos picos de eluição (tr1 e tr2). Observa-se que, as concentrações C1 e C2, para cada volume injetado, equivalem à metade da concentração utilizada nos estudos de sobrecarga da coluna (10 g L^{-1}) pelo fato da mistura ser racêmica e, portanto, equimolar. Ressalta-se ainda que, em termos matemáticos, tr1 e tr2 representam os pontos de máximo para os enantiômeros *S*-(-) e *R*-(+)-verapamil, respectivamente, quando se aplica a *derivada primeira* em cada perfil de eluição.

Os parâmetros da isoterma (Tabela 14) e suas respectivas curvas simuladas (Figura 48) foram determinados de acordo com o modelo de *Langmuir Competitivo Modificado* (Equação 23), cujo termo linear está relacionado aos sítios não-seletivos da FEQ e o não-linear, aos sítios de adsorção enantiosseletivos (NICOUD; SEIDEL-MORGENSTERN, 1996). O software *HELP*® adota este modelo para a simulação.

The screenshot shows the 'HELP 10.3' software interface. It has three tabs: 'Analytical injection', 'Adsorption isotherm', and 'Hydrodynamics'. The 'Analytical injection' tab is active, displaying a table titled 'Overloaded injections' with 7 columns: 'inj', 'Q (mL/min)', 'Vinj (uL)', 'C1 (g/L)', 'C2 (g/L)', 'tr1 (min)', and 'tr2 (min)'. The table contains 6 rows of data for injections 1 through 6. Below the table, there is a section for 'Isotherms parameters' which includes a mathematical equation for $\bar{C}_i$ and a table for parameters λ , NK_i , and N for two cases, 'Esp1' and 'Esp2'. At the bottom right, there are 'CALCULATE' and 'VERIFY' buttons.

inj	Q (mL/min)	Vinj (uL)	C1 (g/L)	C2 (g/L)	tr1 (min)	tr2 (min)
inj 1	1	20	5	5	20.69167	25.83333
inj 2	1	50	5	5	20.58333	25.67500
inj 3	1	100	5	5	20.00000	24.80000
inj 4	1	200	5	5	20.15000	25.10000
inj 5	1	500	5	5	19.40000	24.17500
inj 6	1	600	5	5	19.11667	23.72500

Isotherms parameters

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

	λ	NK_i	N
Esp1	4.5	1.8583	30
Esp2	4.5	4.0483	30

CALCULATE VERIFY

Figura 47. Dados experimentais dos tempos de retenção à meia altura das frentes dos picos de eluição obtidos em condições de sobrecarga da coluna e, parâmetros das equações das isotermas, obtidos por simulação.

Tabela 14. Valores dos parâmetros das isotermas de adsorção estimados pelo *HELP®*

Enantiômero	Parâmetros das isotermas de adsorção ^(*)			
	λ_i	NK_i	N (g/L)	K_i (L/g)
<i>S</i> -(-)-verapamil	4,5	1,8583	30	0,0619
<i>R</i> -(+)-verapamil	4,5	4,0483	30	0,1349

^(*) Os parâmetros λ_i , N e K_i do modelo proposto pelo *HELP®* correspondem aos parâmetros h_i , q_s e b_i da Equação (23), respectivamente.

Portanto, as equações que descrevem o modelo das isotermas de adsorção propostas são:

$$q_{S(-)} = 4,5.C_{S(-)} + \frac{1,8583.C_{S(-)}}{1 + 0,0619.C_{S(-)} + 0,1349.C_{R(+)}} \quad (39)$$

$$q_{R(+)} = 4,5.C_{R(+)} + \frac{4,0483.C_{R(+)}}{1 + 0,0619.C_{S(-)} + 0,1349.C_{R(+)}} \quad (40)$$

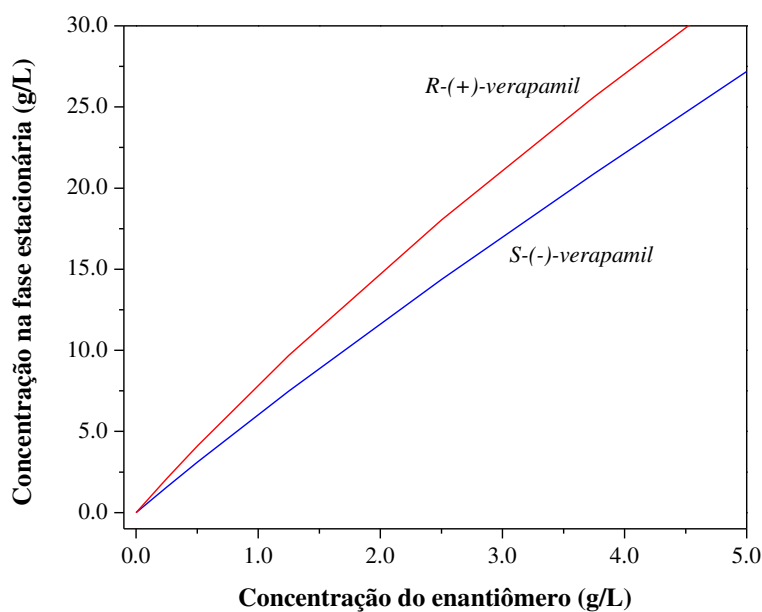


Figura 48. Isotermas de adsorção simuladas para os enantiômeros do verapamil na temperatura de 25 °C utilizando-se coluna Chiralpak® AD (100 x 10 mm, 20 µm).

Conforme reportado por Mazzotti *et al.* (1997), para isoterma de adsorção do tipo *Langmuir Competitiva Modificada*, a constante de Henry (*He*) é definida como a soma dos parâmetros λ_i (ou h_i) (parâmetro linear) e NK_i (ou γ_i) (adsortividade). Portanto, os valores de *He* determinados a partir das isotermas simuladas estão em concordância com os valores obtidos por experimentos de pulsos cromatográficos (Tabela 8, Seção 4.2.3) para ambos os enantiômeros na temperatura de 25 °C, como mostrado na Tabela 15.

Tabela 15. Comparação entre as constantes de Henry obtidas por pulsos cromatográficos e por isotermas de adsorção simuladas a partir de dados experimentais.

Método aplicado	Constante de Henry (<i>He</i>) – Temperatura, 25 °C	
	(<i>He</i>) / <i>S</i> (-)-verapamil	(<i>He</i>) / <i>R</i> -(+)-verapamil
<i>Pulso cromatográfico</i>	6,35	8,56
<i>Isoterma de adsorção</i>	6,36	8,55
<i>Erro absoluto (%)</i>	0,16	0,12

4.3.2.2. Isotermas de adsorção obtidas pelo método da análise frontal

As curvas de ruptura para o verapamil racêmico foram obtidas em diferentes concentrações de alimentação visando determinar as isotermas de adsorção para os respectivos enantiômeros do fármaco. A Figura 49 apresenta as curvas de ruptura para as concentrações de alimentação iguais a 2,5 e 5,0 g L⁻¹, determinadas para a temperatura de 25 °C e vazão de 2,0 mL min⁻¹.

Observando-se a Figura 49, nota-se que, para ambas as concentrações, há um rápido deslocamento, com uma leve inclinação até a formação dos platôs intermediários. Segundo Silva Junior (2006), tal comportamento ocorre devido ao baixo efeito dispersivo apresentado pela coluna Chiralpak® AD. Antes da completa saturação da coluna, ou seja, antes de se atingir o estado de equilíbrio (platô superior), um novo deslocamento ocorre para as concentrações avaliadas, porém, com inclinações relativamente mais acentuadas. Esse comportamento deve-se, provavelmente, à eluição dos enantiômeros *S*(-) e *R*(+)-verapamil, remanescentes na coluna.

Curvas de rupturas similares, com os mesmos comportamentos observados, foram obtidas para os demais experimentos realizados com as diferentes concentrações estudadas, porém, com platôs intermediários mais visíveis a baixas concentrações de alimentação da mistura racêmica.

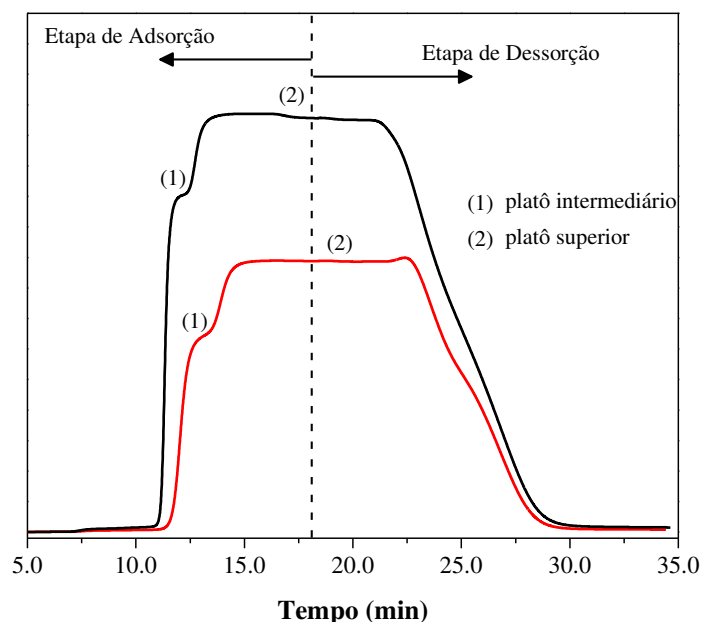


Figura 49. Curvas de ruptura do verapamil racêmico nas concentrações de alimentação iguais a $2,5 \text{ g L}^{-1}$ (vermelho) e $5,0 \text{ g L}^{-1}$ (preto) para vazão de $2,0 \text{ mL min}^{-1}$ e temperatura de $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

As quantidades de ambos os enantiômeros adsorvidas na fase estacionária (q) foram calculadas pela Equação (18), a partir dos tempos de retenção da primeira e segunda frente de adsorção (tr_1 e tr_2) (Figura 50). As concentrações dos platôs superior ($C_{b,i}$) e intermediário ($C_{p,i}$) foram determinadas através dos perfis de concentração dos enantiômeros (Figura 51), obtidos durante a formação das curvas de ruptura conforme método descrito na Seção 3.2.3.2 (*Método da Análise Frontal*).

As isotermas de adsorção competitivas obtidas para os enantiômeros do verapamil, por análise frontal, são mostradas na Figura 52. Observa-se que as isotermas possuem uma região inicial linear muito pequena, para baixas concentrações, seguindo um comportamento de adsorção de acordo com a Lei de Henry. Com o aumento da concentração de alimentação, a

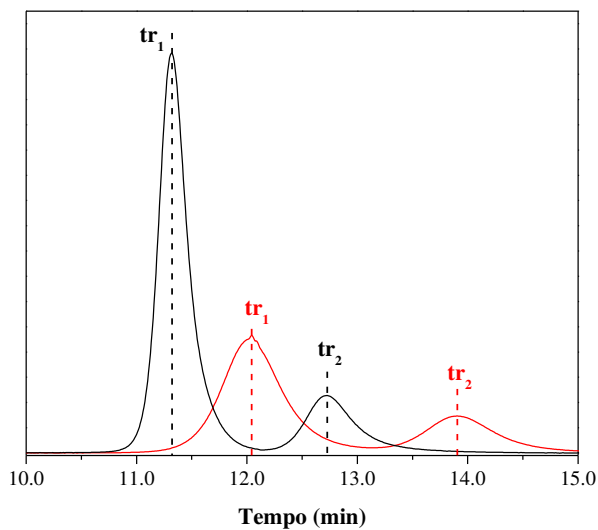


Figura 50. Derivada primeira das curvas de ruptura para obtenção dos tempos de retenção das frentes de adsorção (tr_1 e tr_2). Note que os valores de tr_1 e tr_2 para as concentrações de $2,5 \text{ g L}^{-1}$ (vermelho) e $5,0 \text{ g L}^{-1}$ (preto) correspondem aos pontos de máximo das curvas.

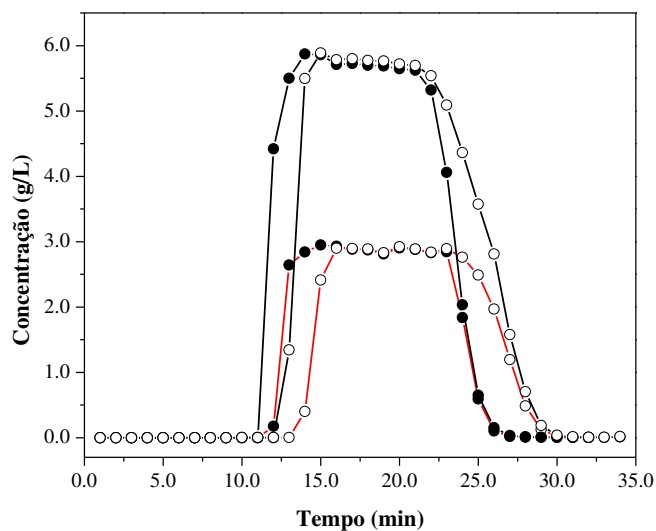


Figura 51. Perfis de concentrações dos enantiômeros (●) *S*-(-)-verapamil e (○) *R*-(+)-verapamil obtidos durante a eluição da mistura racêmica nas concentrações de alimentação $2,5 \text{ g L}^{-1}$ (vermelho) e $5,0 \text{ g L}^{-1}$ (preto).

inclinação da isoterma decresce, assumindo um comportamento não-linear. Conforme reportado por Guiochon *et al.* (1994), esse comportamento deve-se ao decréscimo da quantidade adsorvida do enantiômero menos retido em equilíbrio com a solução e ao aumento da concentração do enantiômero mais retido. A área superficial do adsorvente (FEQ) capaz de acomodar os enantiômeros na camada de adsorção é limitada e o número total de moléculas que podem ser acomodadas é finito. Portanto, com o aumento da concentração, as moléculas competem pelo acesso aos sítios de adsorção e as mais fortemente adsorvidas tendem a excluir as mais fracamente adsorvidas, fenômeno este que determina o caráter competitivo do sistema (SILVA JUNIOR, 2006).

Os parâmetros das isotermas de adsorção (Tabela 16) do modelo *Langmuir Competitivo Modificado* foram estimados por um ajuste não-linear, utilizando o software MATLAB® (versão R2009b).

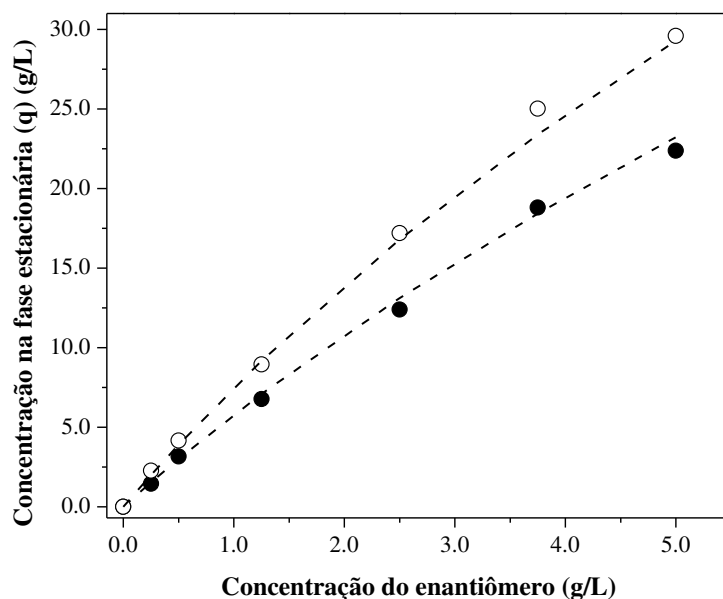


Figura 52. Isotermas de adsorção competitivas do verapamil obtidas por experimentos de análise frontal a vazão de 2,0 mL min⁻¹ para temperatura de 25 °C. (●) *S-(-)-verapamil* e (○) *R-(+)-verapamil*. Dados experimentais ajustados ao modelo de *Langmuir competitivo modificado*.

Tabela 16. Valores dos parâmetros das isotermas de adsorção estimados pelo Matlab®

Enantiômero	Parâmetros das isotermas de adsorção			
	h_i	γ_i	q_s (g/L)	b_i (L/g)
<i>S</i> -(-)-verapamil	2,3	3,97	96,83	0,041
<i>R</i> -(+)-verapamil	2,5	5,68	57,96	0,098

As equações que descrevem o modelo (Equações 41 e 42) são dadas por:

$$q_{S(-)} = 2,3.C_{S(-)} + \frac{3,97.C_{S(-)}}{1 + 0,041.C_{S(-)} + 0,098.C_{R(+)}} \quad (41)$$

$$q_{R(+)} = 2,5.C_{R(+)} + \frac{5,68.C_{R(+)}}{1 + 0,041.C_{S(-)} + 0,098.C_{R(+)}} \quad (42)$$

Conforme mencionado na Seção 4.3.2.1, a constante de Henry (*He*) é definida como a soma dos parâmetros h_i (parâmetro linear) e γ_i (adsortividade) (MAZZOTTI *et al.*, 1997). Portanto, nota-se que os valores de *He* determinados a partir das isotermas de adsorção estão próximos aos valores obtidos por experimentos de pulsos cromatográficos (Tabela 8, Seção 4.2.3) para os enantiômeros na temperatura de 25 °C, como mostrado na Tabela 17.

Tabela 17. Comparação entre as constantes de Henry obtidas por pulsos cromatográficos e por isotermas de adsorção obtidas a partir da análise frontal.

Método aplicado	Constante de Henry (<i>He</i>) – Temperatura, 25 °C	
	(<i>He</i>), <i>S</i> -(-)-verapamil	(<i>He</i>), <i>R</i> -(+)-verapamil
<i>Pulso cromatográfico</i>	6,35	8,56
<i>Isoterma de adsorção</i>	6,27	8,18
<i>Erro absoluto (%)</i>	1,26	4,44

Ressalta-se ainda que, a razão entre as constantes de Henry para os enantiômeros mais retido (*R*-(+)-*verapamil*) e menos retido (*S*-(-)-*verapamil*) fornece o valor do parâmetro cromatográfico seletividade (α), conforme Equação (43) (SARTOR, 2006):

$$\alpha = \frac{He_{R(+)}}{He_{S(-)}} \quad (43)$$

Portanto, o valor da seletividade obtido através da razão das constantes de Henry, determinadas pela isoterma de adsorção ($\alpha = 1,30$) está em concordância com o parâmetro obtido por experimentos de pulso cromatográfico ($\alpha = 1,34$) (Tabela 7, Seção 4.2.2), cujo erro absoluto foi de 2,98 %.

A capacidade de saturação (q_s) para o *R*-(+)-*verapamil* foi igual a 57,96 g L⁻¹ enquanto que para o *S*-(-)-*verapamil* foi de 96,83 g L⁻¹. Esses valores, apesar de relativamente elevados, são considerados valores intermediários quando comparados com dados da literatura e com FEQs disponíveis comercialmente (FRANCOTTE, 2001; MIHLBACHLER *et al.*, 2002).

4.3.2.3. Comparação entre as isotermas de adsorção competitivas

As isotermas de adsorção do tipo *Langmuir competitiva modificada* para os enantiômeros do verapamil, obtidas experimentalmente pelo método da análise frontal (Figura 52) e, determinadas através de simulações (Figura 48) pelo software *HELP®*, foram comparadas entre si, conforme mostrado na Figura 53.

Pode-se observar que as isotermas de adsorção apresentaram perfis muito próximos uma das outras o que, de fato, justifica a concordância entre os valores simulados e experimentais obtidos a partir de dois métodos distintos de determinação de isotermas competitivas. Portanto, a aplicação do método da análise frontal comprova os resultados determinados pelo software e transmite maior confiabilidade aos dados obtidos.

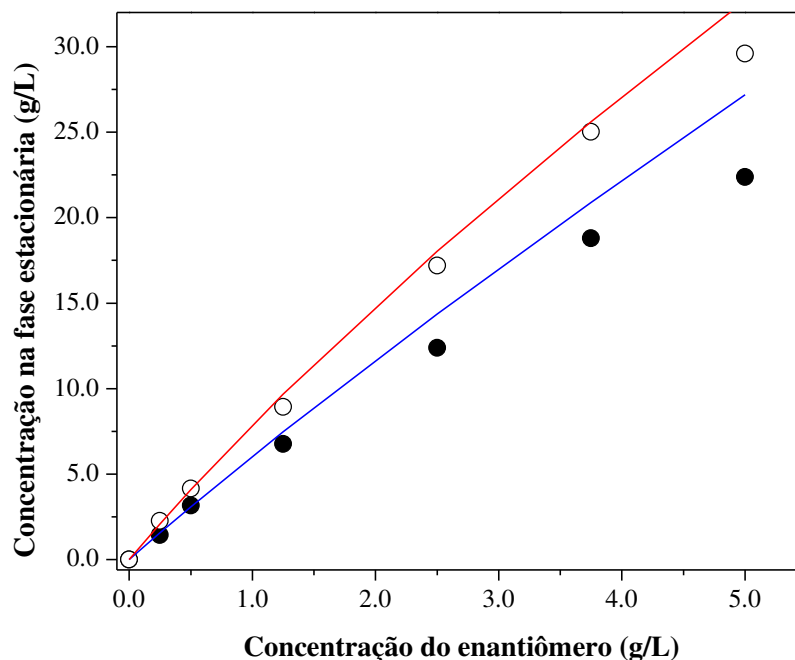


Figura 53. Comparação entre as isothermas de adsorção competitivas obtidas, experimentalmente, pelo método da análise frontal ((●) *S*-(-)-verapamil; (○) *R*-(+)-verapamil) e determinadas, a partir de simulações, pelo software *HELP*® (linha azul – *S*-(-)-verapamil; linha vermelha – *R*-(+)-verapamil).

4.3.3. Separação cromatográfica contínua dos enantiômeros do verapamil

4.3.3.1. Separação contínua na unidade VARICOL®

Parâmetros operacionais

Conforme reportado na Seção 3.2.3.3 (Capítulo 3), os parâmetros operacionais para a unidade VARICOL® foram obtidos a partir do software *HELP*®, considerando-se os resultados experimentais dos perfis de eluição em condições de sobrecarga na coluna (Seção 4.3.1), os dados das injeções analíticas (Seção 4.3.2.1) e os valores dos parâmetros das isothermas de

adsorção dos enantiômeros do verapamil (Seção 4.3.2.1). Além disso, foram inseridos no software dados referentes à queda de pressão ($\Delta P/L$) e ao número de pratos (N_P) da coluna cromatográfica para duas vazões distintas de fase móvel, obtidos através da Equação (3) (Seção 2.3.2, Capítulo 2) (Figura 54).

The screenshot shows the 'HELP 10.3' software window with a menu bar (Help, Files, View, ?) and three tabs: 'Analytical injection', 'Adsorption isotherm', and 'Hydrodynamics'. The 'Hydrodynamics' tab is active, displaying two sections: 'Column efficiency' and 'Pressure drop'.

Column efficiency section:

- Flowrate (mL/min): Two input fields with values 1 and 2.
- Number of plates: Two input fields with values 910 and 539.
- Buttons: 'CALCULATE' and 'VIEW'.
- Formula: $HETP\ (cm) = 1.7 \cdot dp\ (cm) + 0.35643 \cdot u\ (cm/sec)$

Pressure drop section:

- Flowrate (mL/min): Input field with value 1.
- Pressure (bar): Input field with value 1.5.
- Button: 'CALCULATE'.
- Formula: $\frac{\Delta P}{L}\ (bar/cm) = 2.79599 \cdot u\ (cm/sec)$

Figura 54. Dados referentes à análise hidrodinâmica envolvendo a eficiência da coluna.

Também foram introduzidos no software dados referentes às condições operacionais da unidade (pressão máxima de trabalho e as dimensões das colunas cromatográficas utilizadas nos experimentos) e as características da alimentação do processo contínuo (concentração da mistura racêmica de verapamil na fase móvel e a percentagem dos enantiômeros na mistura que, por ser equimolar, corresponde ao valor de 50 %) (Figura 55).

Portanto, com a introdução dos resultados experimentais no *HELP®*, são fornecidos os valores das vazões das correntes de reciclo (Q_{rec}), extrato (Q_{ext}), alimentação (Q_{feed}) e refinado (Q_{raff}), além do tempo de troca (período) das correntes na unidade, o número de colunas por zona de transferência de massa (Zonas I, II, III e IV) e o número de pratos (N_P) por coluna (Figura 56).

Figura 55. Dados referentes às condições operacionais da unidade e às características da alimentação do processo.

Figura 56. Dados de parâmetros operacionais propostos pelo software *HELP*® e introduzidos na unidade VARICOL®.

A separação dos enantiômeros do verapamil foi realizada na unidade VARICOL® utilizando-se seis colunas semi-preparativas Chiralpak® AD (100 x 10 mm, 20 µm), conectadas em série com concentração de alimentação da mistura racêmica do fármaco de 12,5 g L⁻¹, com temperatura de operação mantida constante e igual a 25 °C. A unidade operou com configuração (número de colunas por zona) de 0,98/ 2,66/ 1,40/ 0,96. Os parâmetros operacionais do processo estão dispostos na Tabela 18.

Tabela 18. Parâmetros operacionais para separação dos enantiômeros do verapamil na unidade VARICOL®

Parâmetros do processo	Descrição e valores experimentais
Configuração (coluna por zona)	0,98/ 2,66/ 1,40/ 0,96
Fase estacionária	tris (3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose
Fase móvel	<i>n</i> -hexano: isopropanol etanol dietilamina (90: 5: 5: 0,1 %, v/v/v/v)
Número de colunas	6 colunas com 6 g de FEQ por coluna
Comprimento da coluna	10 cm
Diâmetro da coluna	1 cm
Concentração de alimentação	12,5 g/L
Vazão de alimentação	0,61 mL/min
Vazão de eluente	3,87 mL/min
Vazão de reciclo	10,53 mL/min
Vazão de extrato	3,04 mL/min
Vazão de refinado	1,44 mL/min
Vazão na zona I	10,53 mL/min
Vazão na zona II	7,49 mL/min
Vazão na zona III	8,10 mL/min
Vazão na zona IV	6,66 mL/min
Tempo de troca das correntes	2,8 min
Tempo de ciclo do processo	16,8 min
Comprimento efetivo da coluna I	9,8 cm
Comprimento efetivo da coluna II	26,6 cm
Comprimento efetivo da coluna III	14,0 cm
Comprimento efetivo da coluna IV	9,6 cm
Temperatura	25 °C
Pressão	30 bar

Variáveis de desempenho do processo

Na Tabela 19 estão dispostos os valores das variáveis de desempenho do processo (pureza, produtividade, recuperação e consumo de solvente), obtidos durante a separação cromatográfica contínua dos enantiômeros do verapamil na unidade VARICOL®.

Tabela 19. Variáveis de desempenho para a separação dos enantiômeros de verapamil na unidade VARICOL®

Variáveis de desempenho	Valores experimentais
Pureza enantiomérica <i>S</i> -(-)- <i>verapamil</i>	93,0 %
Pureza enantiomérica <i>R</i> -(+)- <i>verapamil</i>	92,0 %
Produtividade ^(a) <i>S</i> -(-)- <i>verapamil</i>	0,18 kg/kg dia
Produtividade ^(a) <i>R</i> -(+)- <i>verapamil</i>	0,20 kg/ kg dia
Recuperação <i>S</i> -(-)- <i>verapamil</i>	81,0 %
Recuperação do <i>R</i> -(+)- <i>verapamil</i> -	84,0 %
Consumo de solvente	1,46 L/ (g de mistura racêmica alimentada)

^(a) Produtividade expressa em quilogramas de enantiômero por quilogramas de FEQ por dia.

As purezas dos enantiômeros foram determinadas experimentalmente utilizando-se uma coluna analítica Chiralpak® AD (250 x 4,6 mm, 10 µm) (Chiral Technologies®/ Japão), recheada com fase estacionária quiral tris (3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose, em cromatógrafo líquido (Figura 22).

Ao decorrer dos ciclos de operação da unidade, foram coletadas frações das correntes de saída e analisadas para a quantificação da pureza dos enantiômeros no extrato (Figura 57) e refinado (Figura 58). Também foram obtidos os valores das purezas enantioméricas globais, correspondentes a 92,0 % e 93,0 % para as correntes de extrato (*R*-(+)-*verapamil*) e refinado (*S*-(-)-*verapamil*), respectivamente (Tabela 19). A pureza global refere-se às frações coletadas ao longo de todos os ciclos de operação da unidade VARICOL®. As purezas para as correntes de

extrato (Figura 59) e refinado (Figura 60) foram determinadas através da razão entre as respectivas áreas dos picos cromatográficos referentes a cada enantiômero do fármaco.

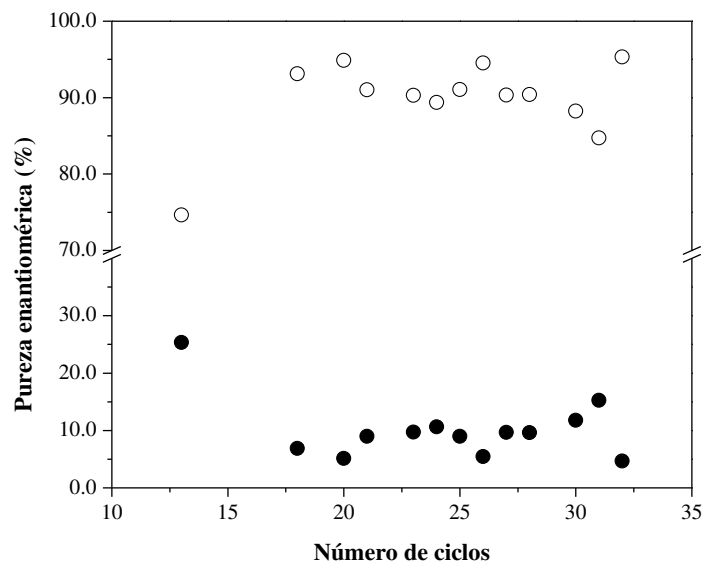


Figura 57. Purezas dos enantiômeros (●) *S*-(-)-verapamil e (○) *R*-(+)-verapamil na corrente de extrato, obtidas ao decorrer dos ciclos de operação da unidade VARICOL®.

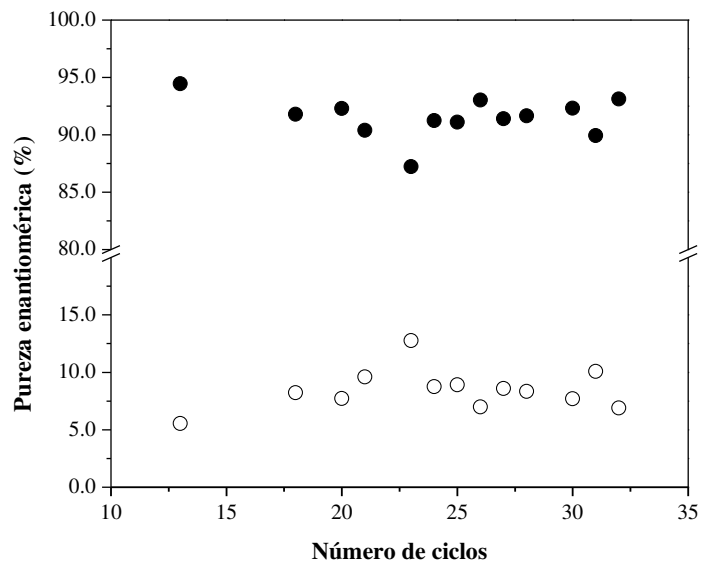


Figura 58. Purezas dos enantiômeros (●) *S*-(-)-verapamil e (○) *R*-(+)-verapamil na corrente de refinado, obtidas ao decorrer dos ciclos de operação da unidade VARICOL®.

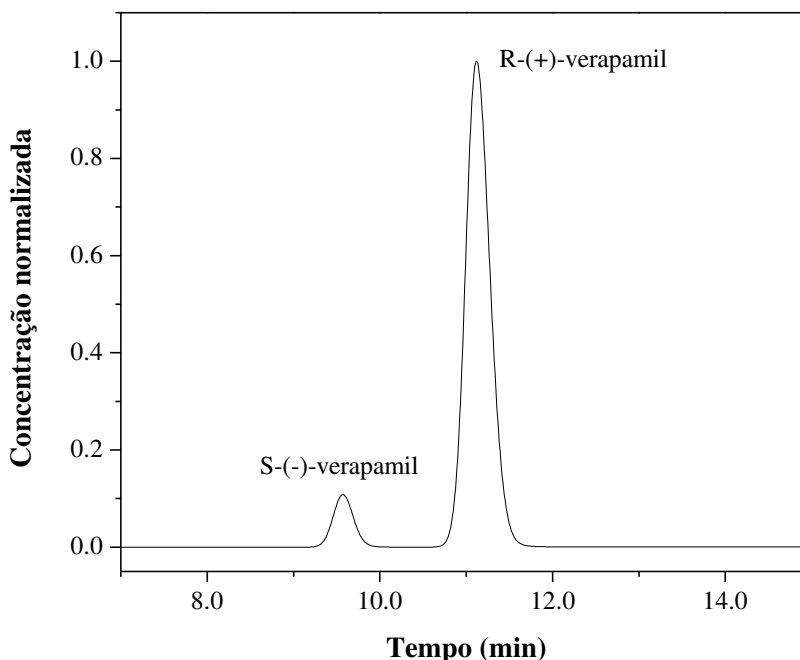


Figura 59. Cromatograma obtido para análise de pureza do enantiômero *R-(+)-verapamil* na corrente de extrato. Fase móvel, *n*-hexano: isopropanol: etanol: dietilamina (90: 5: 5: 0,1 %, v/v/v/v); coluna analítica Chiralpak® AD (250 x 4,6 mm, 10 µm); vazão, 1,0 mL min⁻¹; detecção, 270 nm; volume de injeção, 20 µL.

Visando avaliar o comportamento do processo de separação e a distribuição das concentrações das correntes de extrato e refinado ao decorrer das zonas de separação durante um ciclo operacional completo, foram obtidos os perfis internos de concentração para o ciclo 30. Coletaram-se amostras em tempos específicos para o ciclo selecionado e determinaram-se as concentrações dos enantiômeros para as duas correntes de saída da unidade. Os perfis internos, obtidos experimentalmente, foram comparados aos perfis internos simulados pelo software *HELP*® (Figura 61). Nota-se que os perfis apresentaram comportamentos próximos o que, de fato, garante um desempenho satisfatório do processo de separação.

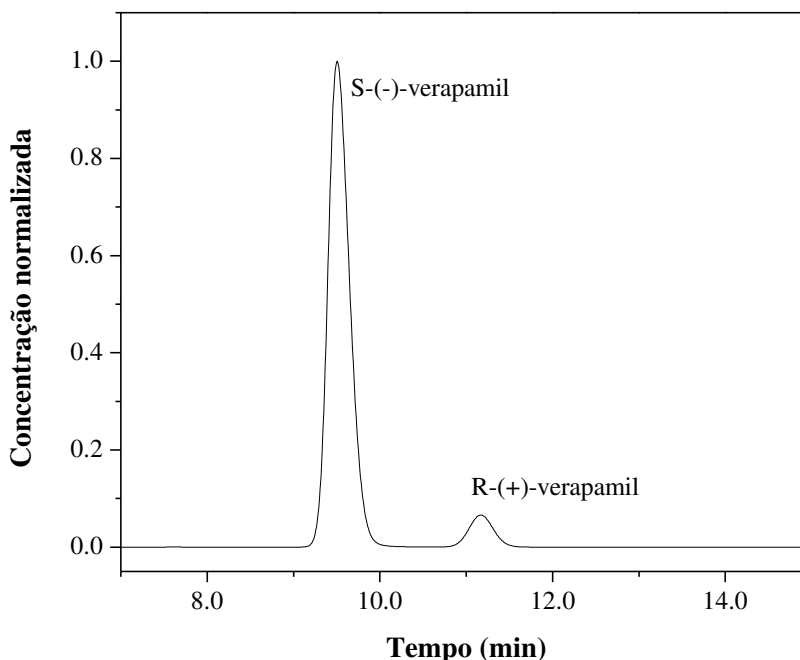


Figura 60. Cromatograma obtido para análise de pureza do enantiômero *S*-(-)-*verapamil* na corrente de refinado. Fase móvel, *n*-hexano: isopropanol: etanol: dietilamina (90: 5: 5: 0,1 %, v/v/v/v); coluna analítica Chiralpak® AD (250 x 4,6 mm, 10 µm); vazão, 1,0 mL min⁻¹; detecção, 270 nm; volume de injeção, 20 µL.

Os enantiômeros separados com suas respectivas purezas globais foram submetidos à análise de rotação óptica específica, em que se obtiveram valores de $[\alpha_D]$ iguais a (+) 7,8 e (-) 8,2 para o *R*-(+)-*verapamil* e *S*-(-)-*verapamil*, respectivamente, para temperatura de 25 °C. Na literatura são reportados valores, para os enantiômeros puros do fármaco, de (±) 8,8 (BHUSHAN; GUPTA, 2005). Portanto, a diferença nos valores de $[\alpha_D]$ deve-se à obtenção dos enantiômeros não completamente puros no presente trabalho.

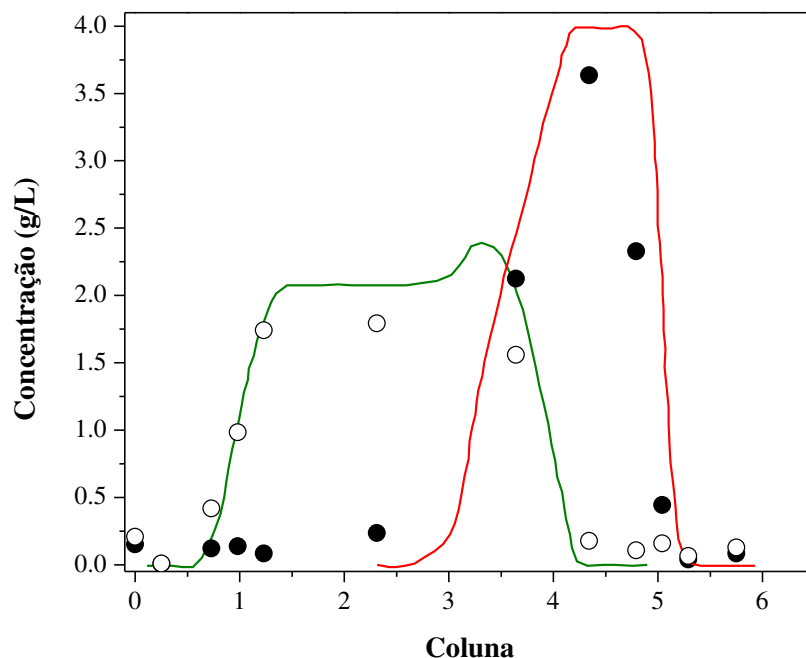


Figura 61. Perfis internos de concentração simulados pelo *HELP*® para as correntes de extrato (linha verde) e refinado (linha vermelha) e, obtidos experimentalmente, durante a separação dos enantiômeros (●) *S*-(-)-*verapamil* e (○) *R*-(+)-*verapamil* no ciclo operacional 30.

4.3.3.2. Separação contínua na unidade LMS

Parâmetros operacionais

Os parâmetros operacionais da unidade LMS foram determinados de forma similar daqueles obtidos para a unidade VARICOL®, ou seja, através do *HELP*®. Inseriu-se no software, portanto, os mesmos resultados experimentais apresentados nas Seções 4.3.1 e 4.3.2.1 e dados contidos nas Figuras 54 e 55 (Seção 4.3.3.1).

Foram obtidos, apenas, valores distintos para as vazões das correntes do processo (reciclo, extrato, refinado e eluente) e para a configuração do leito cromatográfico que, por se tratar de um leito móvel simulado, a unidade foi operada com as zonas de separação contendo

números inteiros de colunas quirais (1/3/1/1). Os parâmetros operacionais para a separação dos enantiômeros do verapamil na unidade LMS estão dispostos na Tabela 20.

Tabela 20. Parâmetros operacionais para separação dos enantiômeros do verapamil na unidade LMS

Parâmetros do processo	Descrição e valores experimentais
Configuração (coluna por zona)	1/ 3/ 1/ 1
Fase estacionária	tris (3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose
Fase móvel	<i>n</i> -hexano: isopropanol etanol dietilamina (90: 5: 5: 0,1 %, v/v/v/v)
Número de colunas	6 colunas com 6 g de FEQ por coluna
Comprimento da coluna	10 cm
Diâmetro da coluna	1 cm
Concentração de alimentação	12,5 g/L
Vazão de alimentação	0,61 mL/min
Vazão de eluente	3,43 mL/min
Vazão de reciclo	10,04 mL/min
Vazão de extrato	3,7 mL/min
Vazão de refinado	0,33 mL/min
Vazão na zona I	10,04 mL/min
Vazão na zona II	6,34 mL/min
Vazão na zona III	6,95 mL/min
Vazão na zona IV	6,62 mL/min
Tempo de troca das correntes	2,8 min
Tempo de ciclo do processo	16,8 min
Comprimento efetivo da coluna I	10,0 cm
Comprimento efetivo da coluna II	30,0 cm
Comprimento efetivo da coluna III	10,0 cm
Comprimento efetivo da coluna IV	10,0 cm
Temperatura	25 °C
Pressão	30 bar

Variáveis de desempenho do processo

Na Tabela 21 estão dispostos os valores das variáveis de desempenho do processo (pureza, produtividade, recuperação e consumo de solvente), obtidos durante a separação cromatográfica contínua dos enantiômeros do verapamil na unidade LMS.

Tabela 21. Variáveis de desempenho para a separação dos enantiômeros de verapamil na unidade LMS

Variáveis de desempenho	Valores experimentais
Pureza enantiomérica <i>S</i> -(-)-verapamil	93,0 %
Pureza enantiomérica <i>R</i> -(+)-verapamil	88,0 %
Produtividade ^(a) <i>S</i> -(-)-verapamil	0,08 kg/kg dia
Produtividade ^(a) <i>R</i> -(+)-verapamil	0,32 kg/ kg dia
Recuperação <i>S</i> -(-)-verapamil	80,0 %
Recuperação do <i>R</i> -(+)-verapamil-	81,0 %
Consumo de solvente	1,40 L/ (g de mistura racêmica alimentada)

^(a) Produtividade expressa em quilogramas de enantiômero por quilogramas de FEQ por dia.

Assim como reportado na Seção 4.3.3.1, as purezas dos enantiômeros foram determinadas experimentalmente utilizando-se uma coluna analítica Chiralpak® AD (250 x 4,6 mm, 10 µm) (Chiral Technologies®/ Japão), recheada com fase estacionária quiral tris (3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose, em cromatógrafo líquido (Figura 22).

Ao decorrer dos ciclos de operação da unidade, foram coletadas frações das correntes de saída e analisadas para a quantificação da pureza dos enantiômeros no extrato (Figura 62) e refinado (Figura 63). Também foram obtidos os valores das purezas enantioméricas globais, correspondentes a 88,0 % e 93,0 % para as correntes de extrato (*R*-(+)-verapamil) e refinado (*S*-(-)-verapamil), respectivamente (Tabela 21). As purezas para as correntes de extrato (Figura 64) e refinado (Figura 65) também foram determinadas através da razão entre as respectivas áreas dos picos cromatográficos referentes a cada enantiômero do fármaco.

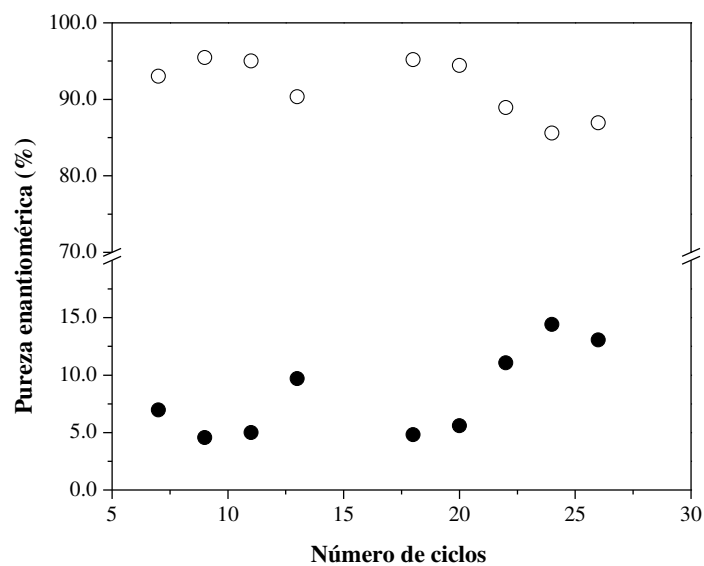


Figura 62. Purezas dos enantiômeros (●) *S*-(-)-*verapamil* e (○) *R*-(+)-*verapamil* na corrente de extrato, obtidas ao decorrer dos ciclos de operação da unidade LMS.

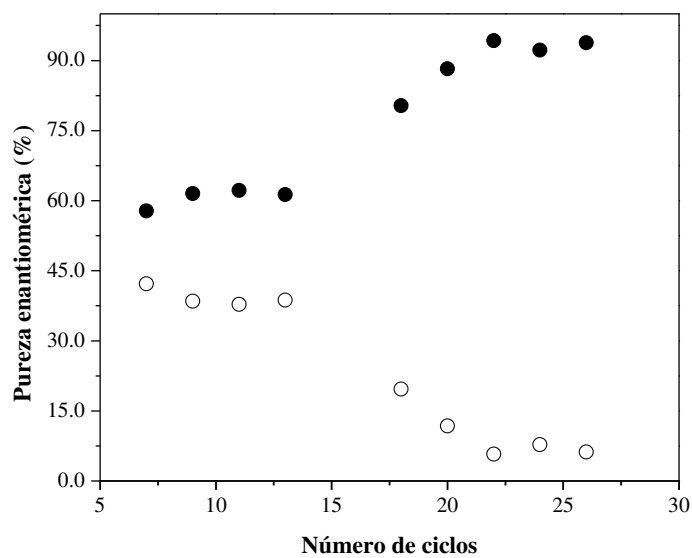


Figura 63. Purezas dos enantiômeros (●) *S*-(-)-*verapamil* e (○) *R*-(+)-*verapamil* na corrente de refinado, obtidas ao decorrer dos ciclos de operação da unidade LMS.

Visando avaliar o comportamento do processo de separação e a distribuição das concentrações das correntes de extrato e refinado ao decorrer das zonas de separação durante um ciclo operacional completo, foram obtidos os perfis internos de concentração para o ciclo 23. Coletaram-se amostras em tempos específicos para o ciclo selecionado e determinaram-se as concentrações dos enantiômeros para as duas correntes de saída da unidade. Os perfis internos, obtidos experimentalmente, foram comparados aos perfis internos simulados pelo software *HELP*® (Figura 66). Nota-se que os perfis apresentaram comportamentos próximos, situação esta em que se comprova o bom desempenho do processo de separação.

Os enantiômeros separados com suas respectivas purezas globais, assim como na Seção 4.3.3.1, também foram submetidos à análise de rotação óptica específica, obtendo-se valores de $[\alpha_D]$ iguais a (+) 7,5 e (-) 8,2 para o *R*-(+)-*verapamil* e *S*-(-)-*verapamil*, respectivamente, a 25 °C. Tais resultados também diferiram dos valores reportados na literatura, justificado pela obtenção de enantiômeros parcialmente puros.

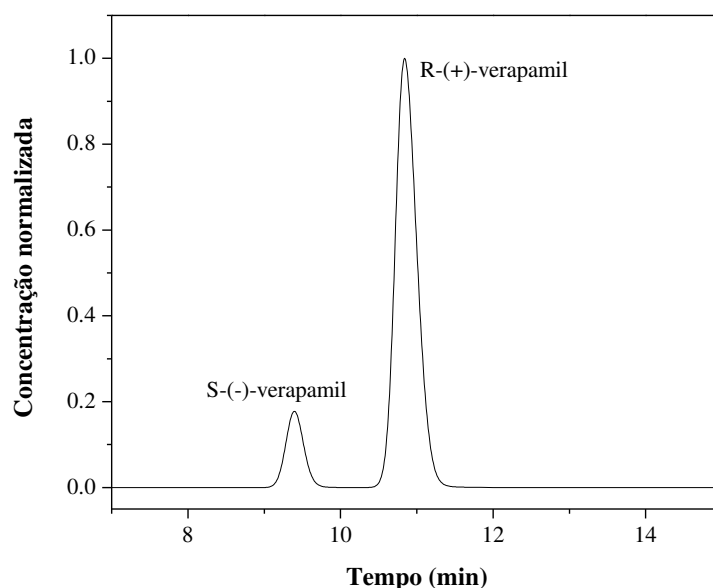


Figura 64. Cromatograma obtido para análise de pureza do enantiômero *R*-(+)-*verapamil* na corrente de extrato. Fase móvel, *n*-hexano: isopropanol: etanol: dietilamina (90: 5: 5: 0,1 %, v/v/v/v); coluna analítica Chiralpak® AD (250 x 4,6 mm, 10 µm); vazão, 1,0 mL/min; detecção, 270 nm; volume de injeção, 20 µL.

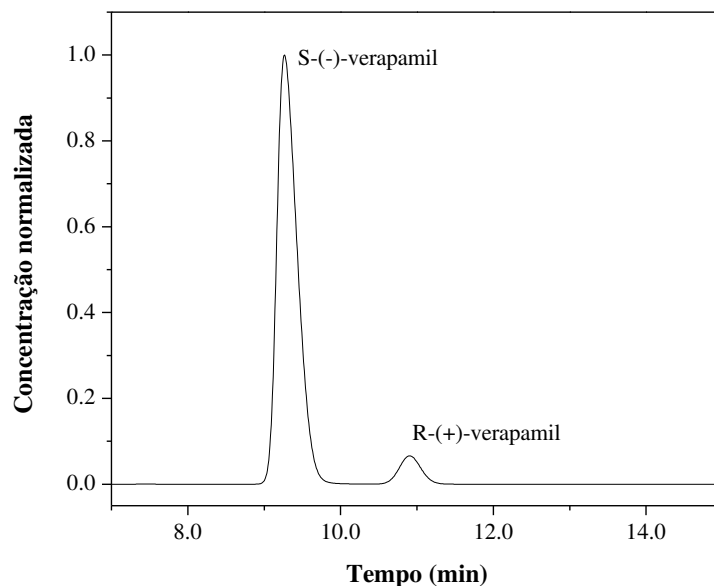


Figura 65. Cromatograma obtido para análise de pureza do enantiômero *S*-(-)-*verapamil* na corrente de refinado. Fase móvel, *n*-hexano: isopropanol: etanol: dietilamina (90: 5: 5: 0,1 %, v/v/v/v); coluna analítica Chiralpak® AD (250 x 4,6 mm, 10 µm); vazão, 1,0 mL/min; detecção, 270 nm; volume de injeção, 20 µL.

É válido ressaltar que, os dados apresentados neste trabalho científico constituem o primeiro conjunto completo de resultados obtidos em escala mundial decorrentes do uso da cromatografia contínua operada nos modos LMS e Varicol® para a separação dos enantiômeros do fármaco verapamil. Este fato, seguramente, garante a originalidade dos resultados alcançados, principalmente, nas áreas de pesquisas do ramo.

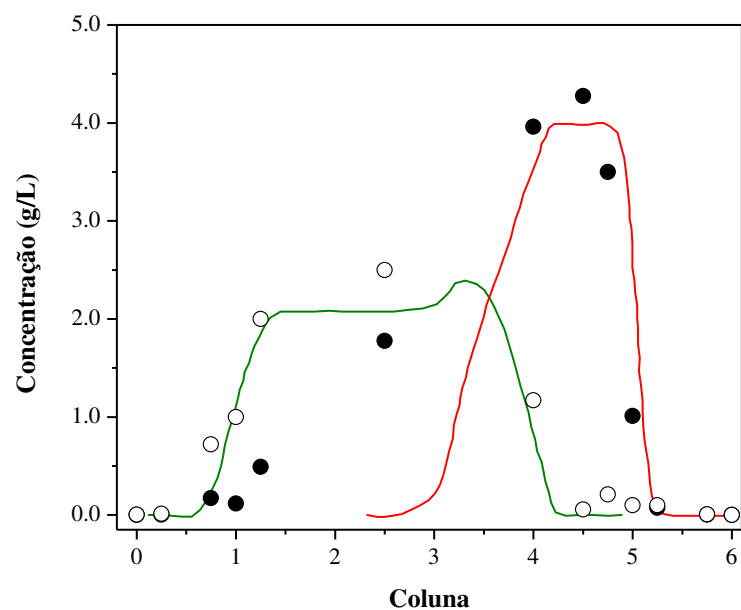


Figura 66. Perfis internos de concentração simulados pelo *HELP*® para as correntes de extrato (linha verde) e refinado (linha vermelha) e, obtidos experimentalmente, durante a separação dos enantiômeros (●) *S*-(-)-*verapamil* e (○) *R*-(+)-*verapamil* no ciclo operacional 23.

Capítulo 5

CONCLUSÕES E SUGESTÕES

5.1. Conclusões finais

Os resultados obtidos neste trabalho mostraram que os enantiômeros do fármaco verapamil foram satisfatoriamente separados em coluna Chiralpak® AD na escala semi-preparativa. A separação ocorreu, praticamente, até a linha de base para todas as temperaturas avaliadas, porém, empregando-se a menor vazão de fase móvel. Os parâmetros cromatográficos obtidos (fatores de retenção, seletividade e resolução) enquadraram-se nas faixas de valores reportados na literatura que classificam a separação como completa.

A coluna quiral foi caracterizada com relação à porosidade total, do leito e das partículas do adsorvente, aplicando-se o método da análise dos momentos. Mesmo para elevadas vazões da fase móvel, a coluna apresentou baixa queda de pressão, tornando-se possível desenvolver a separação do fármaco racêmico nas escalas semi-preparativa e preparativa.

As constantes de Henry obtidas para diferentes temperaturas apresentaram-se relativamente elevadas, revelando a grande afinidade existente entre os enantiômeros e a fase estacionária tris (3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose. O enantiômero *R*-(+)-*verapamil* apresentou maior afinidade, com valores das constantes de equilíbrio superiores ao do seu antípoda óptico, o *S*-(-)-*verapamil*.

Para as maiores temperaturas avaliadas, a coluna Chiralpak® AD apresentou uma rápida cinética de transferência de massa, justificada pelos maiores valores dos coeficientes de transferência de massa global obtidos. No entanto, para baixas temperaturas, o fenômeno ocorreu de forma mais lenta, comprovado pelo maior alargamento das bandas dos picos de eluição. Por outro lado, o coeficiente de dispersão axial sofreu pouca variação entre os enantiômeros.

Quanto aos parâmetros termodinâmicos, foram obtidos valores negativos para as entalpias de adsorção indicando que a permanência dos enantiômeros adsorvidos na fase estacionária é energeticamente mais favorável para o processo. Os valores negativos de entropia mostraram um aumento na ordem do sistema quando os enantiômeros são transferidos das fases móvel para a estacionária. Constatou-se também que a separação enantiomérica foi governada pela entalpia.

As isotermas de adsorção competitivas foram obtidas através de simulações computacionais, aplicando-se o software *HELP*® e, experimentalmente, a partir do método dinâmico da análise frontal. As curvas das isotermas foram satisfatoriamente ajustadas ao modelo de *Langmuir Competitivo Modificado* para a faixa de concentração utilizada. Os perfis simulado e experimental das isotermas mostraram-se próximos, justificando a concordância entre os resultados obtidos a partir de dois métodos distintos para obtenção de isotermas de adsorção.

Em condições de sobrecarga (*overload*) da coluna, os tempos de retenção dos enantiômeros diminuíram com o aumento do volume de injeção, comportamento este característico de isotermas do tipo Langmuir competitivas. Os resultados de sobrecarga mostraram a possibilidade em se trabalhar com concentrações racêmicas e volumes de injeção elevados, permitindo desenvolver as separações quirais do fármaco em larga escala.

Finalizando, pode-se afirmar que, com base nos resultados apresentados, foi possível determinar os parâmetros operacionais para as unidades LMS e VARICOL®. A separação dos enantiômeros do verapamil por processo contínuo multicolumnas mostrou-se promissora, obtendo-se valores satisfatórios para as variáveis de desempenho, principalmente em se tratando do grau de pureza enantiomérica.

Ressalta-se novamente que, os dados apresentados neste trabalho de pesquisa constituem o primeiro conjunto completo de resultados obtidos em escala mundial decorrentes do uso da cromatografia contínua para a separação dos enantiômeros do fármaco racêmico verapamil.

5.2. Sugestões para trabalhos futuros

Diante das conclusões obtidas, propõem-se algumas sugestões para a continuidade deste trabalho. São elas:

- Desenvolver a separação dos enantiômeros do verapamil em colunas quirais Chiralpak® AD analíticas visando determinar os parâmetros termodinâmicos e de transferência de massa e, posteriormente, compará-los aos parâmetros obtidos neste trabalho;
- Realizar estudos de separação dos enantiômeros do verapamil nas unidades VARICOL® e LMS variando-se a concentração de alimentação do processo e o número de colunas quirais nas zonas de transferência de massa (separação);
- Aplicar outras estratégias, como o *método das ondas estacionárias* e o *método dos volumes de separação*, para a obtenção dos parâmetros operacionais do processo contínuo multicolumnas, visando à separação da mistura racêmica do verapamil;
- Promover o estudo econômico, ou seja, a análise de custos, para a separação cromatográfica contínua da mistura racêmica do fármaco;
- Realizar a separação do verapamil racêmico em outras fases estacionárias quirais com a avaliação de outros solventes para a fase móvel;
- Determinar isotermas de adsorção competitivas por outros métodos citados na literatura para comparação dos valores da quantidade adsorvida do fármaco verapamil na fase estacionária utilizada.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABOUL-ENEIN, H.Y., ALI, I. Applications of polysaccharide-based chiral stationary phases for resolution of different compound classes. *Methods in Molecular Biology*, v.243, p.183-196, 2003.

ALEBIC-KOLBAH, T.; ZAVITSANOS, A.P. Chiral bioanalysis by normal phase high-performance liquid chromatography-atmospheric pressure ionization tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, v.759, p.65-77, 1997.

ALI, I.; ABOUL-ENEIN, H.Y. Determination of chiral ratio of o,p-DDT and o,p-DDD pesticides on polysaccharides chiral stationary phases by HPLC under reversed-phase mode. *Environmental Toxicology*, v.17, p.329-333, 2002.

ALI, I.; KUMERER, K.; ABOUL-ENEIN, H.Y. Mechanistic principles in chiral separations using liquid chromatography and capillary electrophoresis. *Chromatographia*, v.63, p.295-307, 2006.

ALI, I.; ABOUL-ENEIN, H.Y. *Chiral Separation Techniques*. Weinheim: WILEY-VCH, 2007.

ALLINGER, N.L.; CAVA, M.P.; DE JONGH, C.R.; LEBEL, N.A.; STEVENS, C.L. *Química Orgânica*. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Dois, 1978, 961 p.

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

ARNOLD, F.H.; BLANCH, H.W.; WILKE, C.R. Analysis of affinity separations II: The characterizations of affinity columns by pulse techniques. *Chemical Engineering Journal*, v.30, p.25-36, 1985a.

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

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

BAI, S.A.; LANKFORD, S.M.; JOHNSON, L.M. Pharmacokinetics of the enantiomers of verapamil in the dog. *Chirality*, v.5, p.436-442, 1993.

BATALIS, N.I.; HARLEY, R.A.; SCHANDL, C.A. Verapamil toxicity: an unusual case report and review of the literature. *The American Journal of Forensic Medicine and Pathology*, v.28, n.2, p.137-140, 2007.

BERMUDEZ, J.A.Z.; BARRAGAT, P. Chiral drugs: from the chemical dimension to political discussion. *Cadernos de Saúde Pública, Rio de Janeiro*, v.12, n.1, p.47-51, 1996.

BERNARDI, A.; JACQUES-SILVA, M.C.; LENZ, G. Abordagem molecular no desenvolvimento de fármacos anti-tumorais. *Infarma*, v.15, n.9-10, p.61-63, 2003.

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

BHATTI, M.M.; FOSTER, R.T. Pharmacokinetics of the enantiomers of verapamil after intravenous and oral administration of racemic verapamil in a rat model. *Biopharmaceutics & Drug Dispositions*, v.18, p.387-396, 1997.

BHUSHAN, R.; GUPTA, D. Thin-layer chromatography separation of enantiomers of verapamil using macrocyclic antibiotic as a chiral selector. *Biomedical Chromatography*, v.19, p.474-478, 2005.

BLASCHKE, G. Chromatographic resolution of chiral drugs on polyamides and cellulose triacetate. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, v.9, p.341-368, 1986.

BOGGIO, RICARDO FROTA. *Efeitos do bloqueador do canal de cálcio (verapamil) sobre fibroblastos dérmicos humanos*. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 2008. 126p. Tese (Doutorado).

BONATO, P.S.; JABOR, V.A.P. Análise enantiosseletiva de fármacos: contribuições da cromatografia líquida de alta eficiência e eletroforese capilar. *Química Nova*, v.28, n.4, p.683-691, 2005.

BRANDSTETEROVÁ, E.; WAINER, I.W. Achiral and chiral high-performance liquid chromatography of verapamil and its metabolites in serum samples. *Journal of Chromatography B*, v.732, p.395-404, 1999.

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

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

CABRERA, K.; LUBDA, D. Influence of temperature on chiral high-performance liquid chromatographic separations of oxazepam and prominal on chemically bonded β -cyclodextrin as stationary phase. *Journal of Chromatography A*, v.666, p.433-438, 1994.

CALDWELL, J. Stereochemical determinants of the nature and consequences of drugs metabolism. *Journal of Chromatography*, v.694, p.39-48, 1995.

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

CAVAZZINI, A.; FELINGER, A.; KACZMARSKI, K.; SZABELSKI, P.; GUIOCHON, G. Study of the adsorption equilibria of the enantiomers of 1-phenyl-1-propanol on cellulose tribenzoate using microbore column. *Journal of Chromatography A*, v.953, p.55-66, 2002.

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

CHANKVETADZE, B. Enantioseparation in capillary chromatography and capillary electrochromatography using polysaccharide-type chiral stationary phases. *Methods in Molecular Biology*, v.243, p.387-399, 2003.

CHARTON, F.; NICOUD, R.M. Complete design of a simulated moving bed. *Journal of Chromatography A*, v.702, p.97-112, 1995.

CIOLA, R. *Fundamentos da cromatografia a líquido de alto desempenho: HPLC*. São Paulo, Editora Edgard Blucher, 1998, 179p.

CLEVELAND, T. Pirkle-concept chiral stationary phases for the HPLC separation of pharmaceutical racemates. *Journal of Liquid Chromatography*, v.18, p.649-671, 1995.

COELHO, F.A.S. Fármacos e quiralidade. *Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola*, n.3, p.23-32, 2001.

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

CONDER, J.; YOUNG, J. *Phisico-chemical measurements by gas chromatography*. New York: Wiley, 1979, 632 p.

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

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

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

DIAS, RAQUEL MACEDO. *Separação cromatográfica quiral do O,P-Diclorodifenildicloroetano (mitotano) em fase estacionária O,O-Bis[4-terc-butylbenzoil]-N,N-dialil-L-tartardiamida*. Campinas: Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2007. 134 p. Tese (Mestrado).

DO, DUONG. *Adsorption analysis equilibria and kinetics*. London: Imperial College Press, 1998, 916 p.

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

ECHIZEN, H.; MANZ, M.; EICHELBAUM, M. Electrophysiologic effects of dextro-verapamil and levo-verapamil on sinus node and AV node function in humans. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, v.12, p.543-546, 1988.

EICHELBAUM, M.; MIKUS, G.; VOGELGESANG, B. Pharmacokinetics of (+)-, (-)-, and (+/-)-verapamil after intravenous administration. *British Journal of Clinical Pharmacology*, v.17, p.453-458, 1984.

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

FELINGER, A.; CAVAZZINI, A.; GUIOCHON, G. Numerical determination of the competitive isotherm of enantiomers. *Journal of Chromatography A*, v.986, p.207-225, 2003.

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

FELIX, G.; BERTHOD, A. Commercial chiral stationary phases for the separations of clinical racemic drugs – Part I: From alimentary tract to cardiovascular system drugs. *Separation and Purification Reviews*, v.36, p.285-481, 2007.

FIEGER, H.; BLASCHKE, G. Direct determination of the enantiomeric ratio of verapamil, its major metabolite norverapamil and gallopamil in plasma by chiral high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography: Biomedical Applications*, v.575, p.255-260, 1992.

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

FRANCOTTE, E.; HUYNH, D. Immobilized halogenophenylcarbamate derivatives of cellulose as novel stationary phases for enantioselective drug analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v.27, p.421-429, 2002.

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

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

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

GIACOMINI, J.C.; NELSON, W.L.; THEODORE, L.; FEE, M.W.; ROOD, D.; GIACOMINI, K.M. The pharmacokinetics and pharmacodynamics of d- and dl- verapamil in rabbits. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, v.7, p.469-475, 1985.

GIOVANNI, O. *Preparative chromatography using supercritical fluids*. Zurich: Swiss Federal Institute of Technology Zurich, 2000. 159 p. Thesis (Doctor).

GOMES, P.S.; RODRIGUES, A.E. Simulated moving bed chromatography: from concept to proof-of-concept. *Chemical Engineering & Technology*, n.1, v.35, p.17-34, 2012.

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

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

GRITTI, F.; CAVAZZINI, A.; MARCHETTI, N.; GUIOCHON, G. Comparison between the efficiencies of columns packed with fully and partially porous C18-bonded silica materials. *Journal of Chromatography A*, v.1157, p.289-303, 2007.

GUIMARÃES, S.; MOURA, D.; SILVA, P. *Terapêutica medicamentosa e suas bases farmacológicas*. Porto, Portugal: Porto Editora, 2006, 1022 p.

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

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

HAAG, J.; VANDE WOUWER, A.; LEHOUCQ, S.; SAUCEZ, P. Modeling and simulation of a SMB chromatographic process designed for enantioseparation. *Control Engineering Practice*, v.9, p.921-928, 2001.

HESSE, G.; HAGEL, R. Eine vollständige Racematisierung durch Elutions-Chromatographie an Cellulose-tri-acetat. *Chromatographia*, v.6, p.277-280, 1973.

HEUER, C.; KUSTERS, E.; PLATTNER, T.; SEIDEL-MORGENSTERN, A. Design of the simulated moving bed process based on adsorption isotherm measurements using a perturbation method. *Journal of Chromatography A*, v.827, p.175-191, 1998.

ICHIDA, A.; SHIBATA, T.; OKAMOTO, I.; YUKI, Y.; NAMIKOSHI, H.; TOGA, Y. Resolution of enantiomers by HPLC on cellulose derivatives. *Chromatographia*, v.19, p.280-284, 1984.

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

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

JACOBSON, C.S.; SEIDEL-MORGENSTERN, A.; GUICHON, G. Study of band broadening in enantioselective separations using microcrystalline cellulose triacetate: I. The linear case. *Journal of Chromatography*, v.637, p.13-18, 1993.

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

KASPEREIT, M.; LORENZ, H.; SEIDEL-MORGENSTERN, A. Coupling of simulated moving bed technology and crystallization to separate enantiomers. *Fundamentals of Adsorption 7, International Adsorption Society, Japan*, p.101-108, 2002.

KIM, J.K.; ABUNASSER, N.; WANKAT, P.C. Use of two feeds in simulated moving beds for binary separations. *Korean Journal of Chemical Engineering*, v.22, n.4, p.619-627, 2005.

KOSTOVA, A.; BART, H.J. Preparative chromatographic separation of amino acid racemic mixtures. I Adsorption isotherms. *Separation Science and Technology*, v.54, p.340-348, 2007.

KUBOTA, T.; KUSANO, T.; YAMAMOTO, C.; YASHIMA, E.; OKAMOTO, Y. Cellulose 3,5-dimethylphenylcarbamate immobilized onto silica gel via copolymerization with a vinyl monomer and its chiral recognition ability as a chiral stationary phase for HPLC. *Chemistry Letters*, p.724-725, 2001.

KURGANOV, A.; DAVANKOV, V.; UNGER, K.; EISENBEISS, F.; KINKEL, J. Unusual peak distortion in ligand-exchange chromatography of enantiomers under overloaded conditions. *Journal of Chromatography A*, v.666, p.99-110, 1994.

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

LANKFORD, S.M.; BAI, S.A. Determination of the stereochemical composition of the major metabolites of verapamil in dog urine with enantioselective liquid chromatographic techniques. *Journal of Chromatography B*, v.663, p.91-101, 1995.

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

LAUB, R.J.; PECSOK, R.L. *Physico-chemical applications of gas chromatography*. New York: Wiley, 1978, 300 p.

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

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

LIM, B.G.; CHING, C.B.; TAN, R.B.H. Determination of competitive adsorption isotherms of enantiomers on a dual-site adsorbent. *Separation Technology*, v.5, p.213-228, 1995.

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

LOURENÇO, T.C.; BATISTA Jr., J.M.; FURLAN, M.; HE, Y.; NAFIE, L.A.; SANTANA, C.C.; CASS, Q.B. Albendazole sulfoxide enantiomers: preparative chiral separation and absolute stereochemistry. *Journal of Chromatography A*, v.1230, p.61-65, 2012.

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

LUDEMANN-HOMBOURGER, O.; NICOUD, R.M.; BAILLY, M. The “VARICOL” process: a new multicolumn continuous chromatographic process. *Separation Science and Technology*, v.35, n.12, p.1829-1862, 2000.

LUDEMANN-HOMBOURGER, O.; PIGORINI, G.; NICOUD, R.M.; ROSS, D.S.; TERFLOTH, G. Application of the “varicol” process to the separation of the isomers of the SB-553261 racemate. *Journal of Chromatography A*, v.947, p.59-68, 2002.

MACHERY-NAGEL. *Guia para colunas cromatográficas*, p.62-66, 2000.

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

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

MATEUS, F.H.; LEPERA, J.S.; MARQUES, M.P.; BORALLI, V.B.; LANCHOTE, V.L. Simultaneous analysis of the enantiomers of verapamil and norverapamil in rat plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v.45, p.762-768, 2007.

MATEUS, FABIANO HENRIQUE. *Influência de solventes na disposição cinética e no metabolismo enantiosseletivo do verapamil em ratos*. Ribeirão Preto: Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 2007. 99p. Tese (Doutorado).

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

McIIHENNY, H.M. Metabolism of [14C]-verapamil. *Journal of Medicinal Chemistry*, v.14, n.12, p.1178-1184, 1971.

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

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

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

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

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

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

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

MORRISON, R.T., BOYD, R.N. *Organic Chemistry*, 6th ed. New Jersey: Prentice-Hall, 1992, 1279p.

NAIA, A.S.; BALTAZAR, M.T.; MARQUES, M.M. Faculdade de Farmácia, Universidade do Porto, 2008. < http://www.ff.up.pt/toxicologia/monografias/ano0708/g57_verapamil/ >. Acesso em 02 de maio de 2011.

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

NICOUD, R.M. The separation of optical isomers by simulated moving bed chromatography. *Pharmaceutical Technology Europe*, 1999.

NISHI, H. Chiral separation by capillary electrophoresis using polysaccharides. *Methods in Molecular Biology*, v.243, p.343-353, 2003.

OKAMOTO, Y.; ABURATANI, R.; MIURA, S.; HATADA, K. Chiral stationary phases for HPLC: Cellulose tris (3,5-dimethylphenylcarbamate) and tris (3,5-dichlorophenylcarbamate) chemically bonded to silica gel. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, v.10, p. 1613-1628, 1987.

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

OKAMOTO, Y.; KAIDA, Y. Resolution by high performance liquid chromatography using polysaccharide carbamates and benzoates as chiral stationary phases. *Journal of Chromatography A*, v.666, p.403-419, 1994.

OKAMOTO, Y.; KAWASHIMA, M.; HATADA, K. Chromatographic resolution.7. Useful chiral packing materials for high-performance liquid chromatographic resolution of enantiomers: phenylcarbamates of polysaccharides coated on silica gel. *Journal of the American Chemical Society*, v.106, p.5357-5359, 1984.

OLIVEROS, L.; LOPEZ, P.; MINGUILLON, C.; FRANCO, P. Chiral chromatography discrimination ability of a cellulose 3,5-dimethylphenylcarbamate/10-undecenoate mixed derivative fixed on several chromatographic matrices. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, v.18, p.1521-1532, 1995.

OLIVEROS, L.; SENSO, A.; FRANCO, P.; MINGUILLON, C. Carbamates of cellulose bonded on silica gel: chiral discrimination ability as HPLC chiral stationary phases. *Chirality*, v.10, p.283-288, 1998.

ORLANDO, R.M.; CARDOSO FILHO, N.; GIL, E.S.; STRINGHETTA, J.P.S. Importância farmacêutica de fármacos quirais. *Revista Eletrônica de Farmácia*, v.4, n.1, p.8-14, 2007.

PAIS, L.S.; LOUREIRO, J.M.; RODRIGUES, A.E. Modeling strategies for enantiomers separation by SMB chromatography. *AIChE Journal*, v.44, n.3, p.561-569, 1998.

PAIS, L.S.; RODRIGUES, A.E. Design of simulated moving bed and varicol processes for preparative separations with a low number of columns. *Journal of Chromatography A*, v.1006, p.33-44, 2003.

PEDEFERRI, M.P.; ZENONI, G.; MAZZOTTI, M.; MORBIDELLI, M. Experimental analysis of a chiral separation through simulated moving bed chromatography. *Chemical Engineering Science*, v.54, p.3735-3748, 1999.

PIRKLE, W.H.; WELCH, C.J. Chromatographic-separation of the enantiomers of acylated amines on chiral stationary phases. *Journal of Organic Chemistry*, v.49, p.138-140, 1984.

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

RAMACHANDRA, U.; SINGLA, M. Surge in Chiral Technologies. *Business Briefing: PharmaGenerics*, p.50-54, 2002.

REID, R.C.; PRAUSNITZ, J.M.; POLING, B.E. *The properties of gases & liquids*, 4^a edition, McGraw-Hill, 1987, 741p.

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

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

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

RODRIGUES, R.C.R.; ARAÚJO, J.M.M.; EUSÉBIO, M.F.J.; MOTA, J.P.B. Experimental assessment of simulated moving bed and varicol processes using a single-column setup. *Journal of Chromatography A*, v.1142, p.69-80, 2007.

ROSA, PAULO CÉSAR PIRES. *Estudo da separação cromatográfica dos enantiômeros do omeprazol em fase estacionária quiral Kromasil CHI-TBB (0,0-Bis[4-terc-butilbenzoil]-N,N-dialil-L-tartadimidamida)*. Campinas: Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2005. 116 p. Tese (Mestrado).

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

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

SARTOR, JOÃO PAULO. *Separação cromatográfica do fármaco rolipram utilizando fase estacionária O,O-bis[4-terc-butilbenzoil]-N,N-dialil-L-tartardimidamida*. Campinas: Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2006. 113p. Tese (Mestrado).

SATOH, K.; YANAGISAWA, T.; TAIRA, N. Coronary vasodilator and cardiac effects of optical isomers of verapamil in the dog. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, v.2, p.309-318, 1980.

SAWICKI, W. A validated method for the determination of verapamil and norverapamil in human plasma. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v.25, p.689-695, 2001.

SCHMIDT-TRAUB, H. *Preparative Chromatography: of fine chemicals and pharmaceutical agents*. Wheinheim, Germany: Wiley-VCH®, 2005, 485p.

SCHRAMM, H.; KASPEREIT, M.; KIENLE, A.; SEIDEL-MORGENSTERN, A. Simulated moving bed process with cyclic modulation of the feed concentration. *Journal of Chromatography A*, v.1006, p.77-86, 2003.

SCHULTE, M.; DITZ, R.; DEVANT, R. M.; KINKEL, J. N.; CHARTON, F.; Comparison of the specific productivity of different chiral stationary phases used for simulated moving-bed chromatography. *Journal of Chromatography A*, v.769, p.93-100, 1997.

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

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

SEIDEL-MORGENSTERN, A.; GUICHON, G. Modeling of the competitive isotherms and the chromatographic separation of two enantiomers. *Chemical Engineering Science*, v.48, n.5, p.2787-2797, 1993.

SEWELL, P.A.; CLARKE, B.; KEALEY, D. *Chromatographic separation*. London, United Kingdom: John Wiley & Sons, 1988, 356 p.

SHIBUKAWA, A.; WAINER, I.W. Simultaneous direct determination of the enantiomers of verapamil and norverapamil in plasma using a derivatized amylose high-performance liquid chromatographic chiral stationary phase. *Journal of Chromatography: Biomedical Applications*, v.574, p.85-92, 1992.

SILVA JÚNIOR, ABSOLON CARVALHO. *Separação cromatográfica do O,P'-diclorodifenildicloroetano (mitotano) em fase estacionária quiral tris-3-cloro-4-metilfenilcarbamato de celulose e tris-3,5 dimetilfenilcarbamato de amilose*. Campinas:

Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2010. 121 p. Tese (Mestrado).

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

SILVA Jr., A.C.; SALLES Jr., A.G.; PERNA, R.F.; CORREIA, C.R.D.; SANTANA, C.C. Chromatographic separation and purification of mitotane racemate in a varicol multicolumn continuous process. *Chemical Engineering & Technology*, v.35, n.1, p.83-90, 2012.

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

SILVA JUNIOR, IVANILDO JOSÉ DA. *Estudo cinético e de equilíbrio na separação cromatográfica dos enantiômeros da cetamina em triacetato de celulose microcristalina*. Campinas: Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2003. 87p. Tese (Mestrado).

SILVA JUNIOR, IVANILDO JOSÉ DA. *Separação cromatográfica dos enantiômeros do anestésico bupivacaína e projeto de condições de operação em leito móvel simulado*. Campinas: Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2006, 162 p. Tese (Doutorado).

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

SINGHAL, P.; YADAV, M.; WINTER, S.; GUTTIKAR, S.; PATEL, D.; MILLS, M.; SHRIVASTAV, P.S. Enantiomeric separation of verapamil and its active metabolite, norverapamil, and simultaneous quantification in human plasma by LC-ESI-MS-MS. *Journal of Chromatographic Science*, v.50, p.839-848, 2012.

SNYDER, L.R.; KIRKLAND, J.J. *Introduction to modern liquid chromatography*. New York: John Wiley & Sons, 1979, 863 p.

SOLOMONS, T.W.G. *Química Orgânica*, Vol. 1. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos, 1996, 777 p.

STRINGHAM, R.; LYNAM, K.; LORD, B. Memory effects of diethylamine mobile phase additive on chiral separation on polysaccharide stationary phases. *Chirality*, v.16, p.493-498, 2004.

SUBRAMANI, H.J.; HIDAJAT, K.; RAY, A.K. Optimization of simulated moving bed and varicol processes for glucose-fructose separation. *Trans IChemE*, Part A, v.81, p.549-567, 2003.

SUN, L.; ZHANG, S.; ZHONG, D. *In vitro* identification of metabolites of verapamil in rat liver microsomes. *Acta Pharmacologica Sinica*, v.25, n.1, p.121-128, 2004.

SUN, S.; YANG, G.; SUN, H.; WANG, D.; LIU, H. Determination and comparison of competitive isotherms by rectangular pulse method and frontal velocity analysis method. *Journal of Chromatography A*, v.918, p.13-23, 2001.

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

TOUMI, A.; HANISCH, F.; ENGELL, S. Optimal operation of continuous chromatographic processes: mathematical optimization for the VARICOL process. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, v.41, p.4328-4337, 2002.

UEHARA, H.; NAKAIZUMI, A.; BABA, M.; IISHI, H.; TATSUTA, M. Inhibition by verapamil of hepatocarcinogenesis induced by N-nitrosomorpholine in Sprague-Dawley rats. *British Journal of Cancer*, v.68, p.37-40, 1993.

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

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

WALLES, M.; THUM, T.; LEVSEN, K. Metabolism of verapamil: 24 new phase I and phase II metabolites indentified in cell cultures of rats hepatocytes by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B: Biomedical Applications*, v.798, p.265-274, 2003.

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

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

WANG, X.; CHING, C.B. Kinetic and equilibrium study of the separation of three chiral center drug, nadolol, by HPLC on a novel perphenyl carbamoylated β -cyclodextrin bonded chiral stationary phase. *Separation Science Technology*, v.37, n.11, p.2567-2586, 2002.

WARMANN, S.; GOHRING, G.; TEICHMANN, B.; GEERLINGS, H.; FUCHS, J. MDR1 modulators improve the chemotherapy response of human hepatoblastoma to doxorubicin *in vitro*. *Journal of Pediatric Surgery*, v.37, p.1579-1584, 2002.

WELCH, C.J. Crawling out of the chiral pool – the evolution of pirkle-type chiral stationary phases. *Advances in Chromatography*, v.35, p.171-197, 1995.

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

YAMAMOTO, C., OKAMOTO, Y. Chiral separation by HPLC using polysaccharide-based chiral stationary phases. *Methods in Molecular Biology*, v.243, p.173-181, 2003.

YASHIMA, E.; FUKAYA, H.; OKAMOTO, Y. 3,5-dimethylphenylcarbamates of cellulose and amylose regioselectively bonded to silica gel as chiral stationary phases for high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, v. 677, p.11-19, 1994.

YASHIMA, E.; OKAMOTO, Y. Chiral discrimination on polysaccharides derivatives. *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, v.68, n.12, p.3289-3307, 1995.

YE, Y.K.; STRINGHAM, R. Effects of mobile phase amine additives on enantioselectivity for phenylalanine analogs. *Journal of Chromatography A*, v. 927, p.53-60, 2001.

YOSHIDA, M.I.; GOMES, E.C.L.; SOARES, C.D.V.; CUNHA, A.F.; OLIVEIRA, M.A. Thermal analysis applied to verapamil hydrochloride characterization in pharmaceutical formulations. *Molecules*, v.15, p.2439-2452, 2010.

ZEBKA, M.; RODRIGUES, A.E. Measurement of pore diffusivity of R,S- α -Tetralol enantiomers in chiral adsorbent CHIRALPAK AD by zero length column method. *Separation and Purification Technology*, v.57, p.74-84, 2007.

ZHANG, T., KIENTZY, C., FRANCO, P., OHNISHI, A., KAGAMIHARA, Y., KUROSAWA, H. Solvent versatility of immobilized 3,5-dimethylphenylcarbamate of amylose in enantiomeric separations by HPLC. *Journal of Chromatography A*, v.1075, p.65-75, 2005.

ZHANG, Y.; HIDAJAT, K.; RAY, A.K. Multi-objective optimization of simulated moving bed and varicol processes for enantio-separation of racemic pindolol. *Separation and Purification Technology*, v.65, p.311-321, 2009.

ZHANG, Y.; HIDAJAT, K.; RAY, A.K. Determination of competitive adsorption isotherm parameters of pindolol enantiomers on α_1 -acid glycoprotein chiral stationary phase. *Journal of Chromatography A*, v.1131, p.176-184, 2006.

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

ZHANG, Z.; MAZZOTTI, M.; MORBIDELLI, M. Powerfeed operation of simulated moving bed units: changing flow-rates during the switching interval. *Journal of Chromatography A*, v.1006, p.87-99, 2003.

ZHOU, D.; CHERRAK, D.E.; KACZMARSKI, K.; CAVAZZINI, A.; GUIOCHON, G. Prediction of the band profiles of the mixtures of the 1-indanol enantiomers from data acquired with single racemic mixture. *Chemical Engineering Science*, v.58, p.3257-3272, 2003.

ZHOU, D.; KACZMARSKI, K.; GUIOCHON, G. Comparison of the binary equilibrium isotherms of the 1-indanol enantiomers on three high-performance liquid chromatography columns of different sizes. *Journal of Chromatography A*, v.1015, p.73-87, 2003.

Apêndice A

Espectro de absorção

Obteve-se um espectro de absorção no UV-VIS com a mistura racêmica do verapamil ($0,5 \text{ mg mL}^{-1}$) solubilizada em fase móvel. A Figura 67 mostra a variação de absorbância do fármaco em função do comprimento de onda. Pode-se observar que há resultado de absorbância para a mistura na faixa compreendida entre 260 a 290 nm. Nos experimentos foram utilizados comprimentos de onda iguais a 270 nm, salvo quando mencionado outro valor.

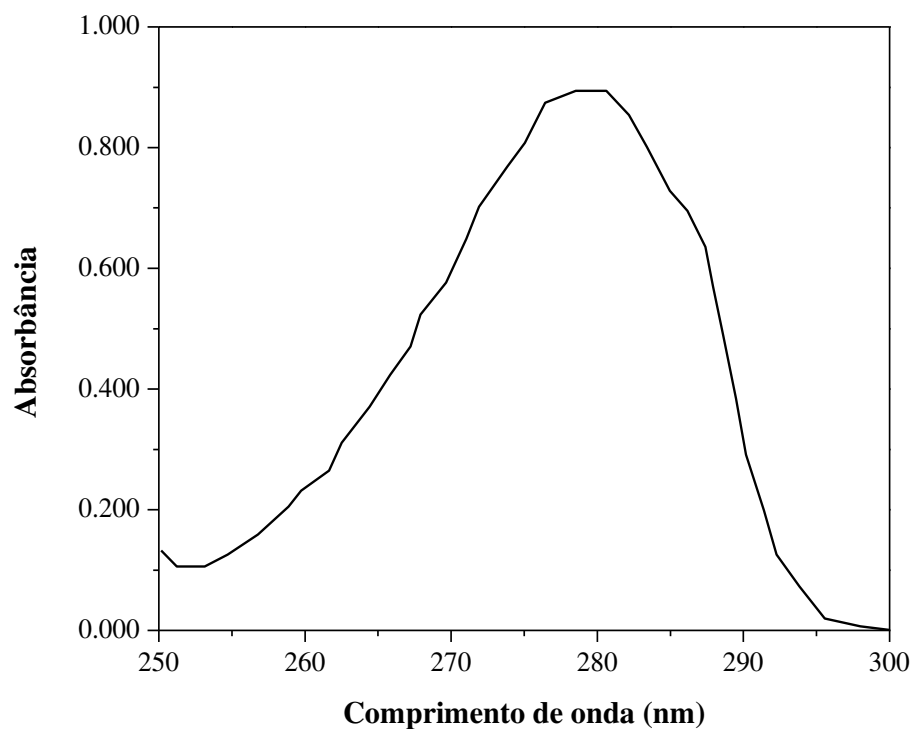


Figura 67. Espectro de absorção no UV-VIS para a mistura racêmica do fármaco verapamil ($0,5 \text{ mg mL}^{-1}$).

Apêndice B

Curva analítica

No presente trabalho, as curvas analíticas (Figuras 68 e 69) são referências que se têm para a determinação da concentração das amostras coletadas ao longo do perfil das curvas de ruptura, no quesito isothermas de adsorção e, indispensáveis à obtenção das purezas enantioméricas e dos perfis internos de concentração quanto ao estudo do processo de separação cromatográfica contínua em LMS e VARICOL[®].

As curvas analíticas foram obtidas pela injeção, em triplicata, de 20 µL da solução da mistura racêmica de verapamil em diferentes concentrações (0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0; 2,0; 4,0; 6,0; 8,0; 10,0; 20,0 mg mL⁻¹) em coluna analítica Chiralpak[®] AD (250 mm x 4,6 mm, 10 µm) a 25 °C. Como fase móvel utilizou-se hexano: isopropanol: etanol: dietilamina nas proporções de 90:5:5:0,1 % (em volume), respectivamente

Os enantiômeros foram eluídos da coluna a uma vazão de 1,0 mL min⁻¹ e detectados a 270 nm. A média das áreas dos picos das injeções de cada solução foi utilizada para traçar as curvas analíticas que são definidas como a concentração da injeção *versus* a área dos picos de resposta do pulso cromatográfico.

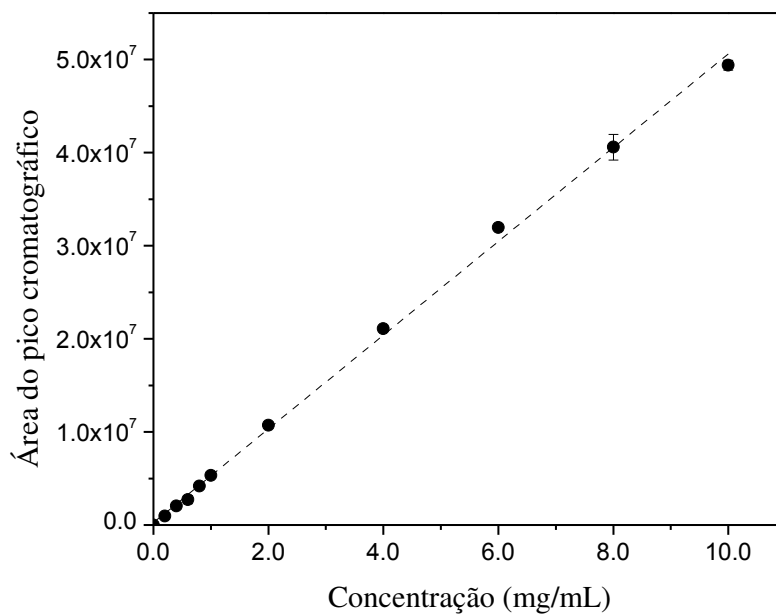


Figura 68. Curva analítica para o enantiômero *S*-(-)-*verapamil* ($r^2 = 0,99829$).

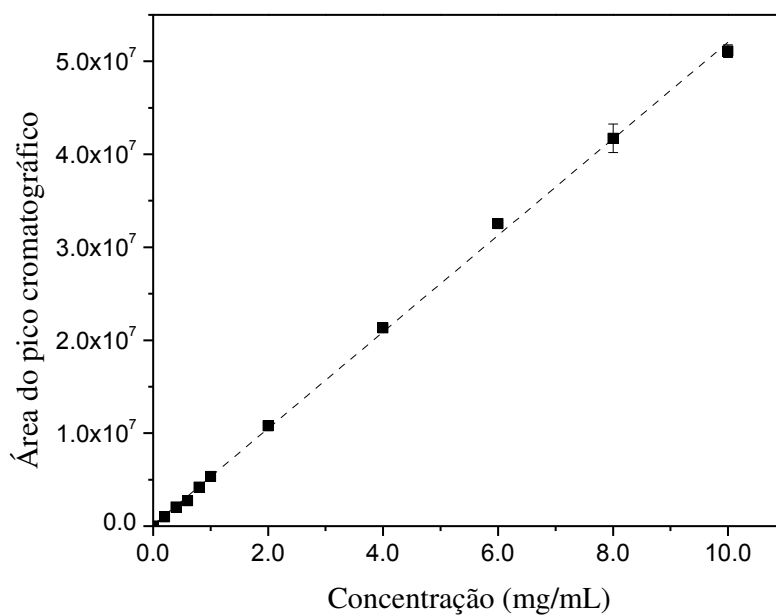


Figura 69. Curva analítica para o enantiômero *R*-(+)-*verapamil* ($r^2 = 0,99898$).

Apêndice C

Viscosidade da fase móvel

A viscosidade da fase móvel (mistura ternária) foi calculada a partir da correlação proposta por Grunberg e Nissan (1949) (REID *et al.*, 1987), para a temperatura de 25 °C (Equação 44).

$$\ln(\eta_m) = \sum_i x_i \ln(\eta_i) + \left(\frac{1}{2}\right) \sum_i \sum_j x_i x_j G_{i,j} \quad (44)$$

em que, x corresponde a fração molar dos componentes da mistura; η refere-se a viscosidade dos componentes individuais (em cP); e G é o parâmetro de interação entre os compontes i e j .

Desenvolvendo a Equação (44) para a mistura ternária, tem-se que:

$$\begin{aligned} \ln(\eta_m) = & x_{HEX} \ln(\eta_{HEX}) + x_{EtOH} \ln(\eta_{EtOH}) + x_{IPA} \ln(\eta_{IPA}) + \left(\frac{1}{2}\right) (x_{HEX} x_{EtOH} G_{EtOH / HEX} + \dots \\ & \dots + x_{HEX} x_{IPA} G_{IPA / HEX} + x_{EtOH} x_{IPA} G_{IPA / EtOH} \end{aligned} \quad (45)$$

Tabela 22. Frações volumétrica e molar e viscosidade dos componentes da FM

Componente	Fração volumétrica	Fração molar	Viscosidade (cP) (25 °C)
<i>n-hexano</i>	0,90	0,825	0,294
<i>etanol</i>	0,05	0,103	1,100
<i>isopropanol</i>	0,05	0,078	1,960

CÁLCULO DOS PARÂMETROS DE INTERAÇÃO (G_{ij})

O cálculo dos parâmetros de interação G_{ij} foram efetuados para todas as combinações possíveis dos componentes da solução à temperatura de 25 °C (Equação 46). Vale ressaltar que,

na Equação (46), o valor de W é nulo, pois a solução contém outros átomos além de carbono e hidrogênio (isto é, oxigênio presente nos álcoois).

$$G_{i,j} = [\sum \Delta_i - \sum \Delta_j] + W \quad (46)$$

em que, Δ corresponde a valores de contribuições de grupos (tabelados) disponíveis em Reid *et al.* (1987).

Cálculo de $G_{EtOH/HEX}$ ($i = etanol; j = n-hexano$)

Pela Equação (46), tem-se que:

$$G_{EtOH/HEX} = [(-0,100) + 0,096 + (-0,023)] - [2.(-0,100) + 4.(0,096)] + 0 = -0,211$$

Cálculo de $G_{IPA/HEX}$ ($i = isopropanol; j = n-hexano$)

Pela equação (46), tem-se que:

$$G_{IPA/HEX} = [2.(-0,100) + 0,204 + (-0,443)] - [2.(-0,100) + 4.(0,096)] + 0 = -0,623$$

Cálculo de $G_{IPA/EtOH}$ ($i = isopropanol; j = etanol$)

Pela equação (46), tem-se que:

$$G_{IPA/EtOH} = [2.(-0,100) + 0,204 + (-0,443)] - [(-0,100) + 0,096 + (-0,023)] = -0,412$$

A Tabela 23 mostra os valores dos parâmetros de interação G_{ij} calculados para todas as possíveis combinações dos componentes orgânicos.

Tabela 23. Valores dos parâmetros de interação (G_{ij}) para temperatura de 25 °C

Combinação	G_{ij} (25 °C)
<i>Etanol / n-hexano</i>	-0,211
<i>Isopropanol / n-hexano</i>	-0,623
<i>Isopropanol / etanol</i>	-0,412

Finalmente, aplicando-se a Equação (45), foi possível determinar a viscosidade da mistura ternária (η_m), conforme cálculo abaixo:

$$\ln(\eta_m) = 0,825 \cdot \ln(0,294) + 0,103 \cdot \ln(1,100) + 0,078 \cdot \ln(1,96) + (1/2) \cdot [0,825 \cdot 0,103 \cdot (-0,211) + 0,825 \cdot 0,078 \cdot (-0,623) + 0,103 \cdot 0,078 \cdot (-0,412)]$$

Portanto, para a temperatura de 25 °C, a viscosidade da mistura ternária (η_m) é igual a **0,38 cP**.