



JEAN VINÍCIUS MOREIRA

**ESTUDO TERMODINÂMICO DA REGIÃO LINEAR DAS ISOTERMAS
DE ADSORÇÃO EM SÍLICA C₁₈ PARA OS COMPONENTES DA
SÍNTESE DO PIPERONAL A PARTIR DO ÓLEO ESSENCIAL DA
PIPER HISPIDINERVUM C. DC**

Campinas
2013



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA

JEAN VINÍCIUS MOREIRA

**ESTUDO TERMODINÂMICO DA REGIÃO LINEAR DAS ISOTERMAS
DE ADSORÇÃO EM SÍLICA C₁₈ PARA OS COMPONENTES DA
SÍNTESE DO PIPERONAL A PARTIR DO ÓLEO ESSENCIAL DA
*PIPER HISPIDINERVUM C. DC***

Orientador: Prof. Dr. Marco Aurélio Cremasco

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

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO
DEFENDIDA PELO ALUNO CARLOS EDUARDO LIMA DE OLIVEIRA
E ORIENTADA PELO PROF. DR. MARCO AURÉLIO CREMASCO

Assinatura do orientador



Prof. Dr. Marco Aurélio Cremasco
Orientador

CAMPINAS
2013

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

M813e Moreira, Jean Vinícius, 1986-
Estudo termodinâmico da região linear das isothermas de adsorção em sílica C₁₈ para os componentes da síntese do piperonal a partir do óleo essencial da *Piper hispidinervum* C. DC / Jean Vinícius Moreira. – Campinas, SP : [s.n.], 2013.

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

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

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Thermodynamic study of the linear region of adsorption isotherms in C₁₈ silica for compounds of piperonal synthesis from *Piper hispidinervum* C. DC essential oil

Palavras-chave em inglês:

Piperonal

Thermodynamic

Adsorption

High performance liquid chromatography

Área de concentração: Engenharia de Processos

Titulação: Mestre em Engenharia Química

Banca examinadora:

Marco Aurélio Cremasco [Orientador]

Marco Aurélio Cremasco

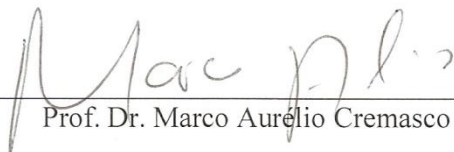
Mary Ann Foglio

Gustavo Paim Valença

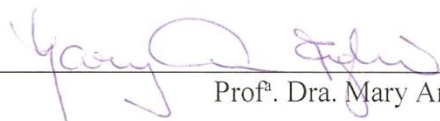
Data de defesa: 21-08-2013

Programa de Pós-Graduação: Engenharia Química

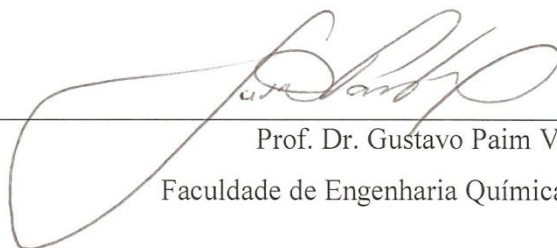
Dissertação de Mestrado defendida por Jean Vinícius Moreira e aprovada em 21 de Agosto de 2013 pela banca examinadora constituída pelos doutores:



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

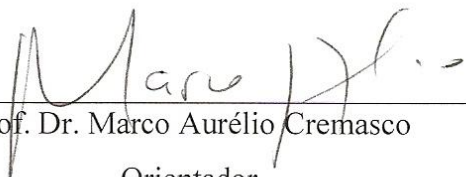


Prof.ª Dra. Mary Ann Foglio
Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas– UNICAMP



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

Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação de Mestrado em Engenharia Química defendida por Jean Vinícius Moreira e aprovada em 21 de Agosto de 2013.



Prof. Dr. Marco Aurélio Cremasco
Orientador

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente ao meu pai, Jorge Moreira, pela ajuda, incentivo e apoio que me concedeu, desde o começo. Sempre esperando meu melhor. Espero que eu tenha atendido suas expectativas.

A minha mãe e irmã, Sueli Maciel e Jéssica Moreira, por todas as conversas, risadas e tempos de descontração, embora não nos vejamos com muita frequência, sempre estaremos ligados pelos laços da amizade e amor.

Aos meus avós, Lauro Maciel de Souza e Maria Lopes de Souza serão sempre para mim um exemplo e donos dos meus melhores momentos.

Ao professor Marco Aurélio Cremasco pela oportunidade do trabalho e experiência de trabalhar com algo diferente, pela orientação e disposição que teve comigo.

Aos meus amigos, que de uma maneira, às vezes imperceptível me ajudaram tanto. Mesmo correndo o risco de esquecer alguém, seria injusto não nomeá-los, Ana Carolina, Carla Aiolfi, Vilma Aiolfi, Carolina Camerin, Carlos Oliveira, Wilson Murilo, Alex, Rosely, Sandra, Stella, Rodrigo Amaral, Helder Moura, Rafael Firmani, Raphael Ribeiro, Hugo, Vicente, Ivanei, Rhelvis, Giselle, Rossana, Tatiane Silva, Neta, Virgínia e Thaís Almeida.

Um agradecimento especial para a Fabiana, pois sei que ela acredita em mim, e sempre me apoiará. Obrigado. Espero poder retribuir toda a ajuda e apoio.

Aos meus amigos em Telêmaco Borba, em especial para a Elisangela e Gilmar, que se tornaram mais que amigos, mas irmãos para mim.

Ao programa de pós graduação da Faculdade de Engenharia Química da UNICAMP por ter-me concedido a oportunidade de prosseguir em meus estudos, e aos funcionários e funcionárias da FEQ. Ao apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

A todos que de uma maneira ou outra me ajudaram a chegar até aqui, acho que foram tantas pessoas que me apoiaram, ou mesmo me desencorajaram, afinal, todos temos convicções diferentes. Cada um opina conforme seus conhecimentos. Agradeço a todos e sempre agradecerei.

*"I've stumbled on the side of
twelve misty mountains
I've walked and I've crawled
on six crooked highways
I've stepped in the middle of
seven sad forests
I've been out in front of a
dozen dead oceans
I've been ten thousand miles
in the mouth of a graveyard
And it's a hard, and it's a
hard, it's a hard, and it's a
hard...
And it's a hard rain's a-gonna
fall"*

Bob Dylan

Resumo

O piperonal (ou heliotropina) apresenta aplicações industriais no ramo de cosméticos como fixador de fragrâncias, além de ser matéria prima para componentes de maior valor agregado, como a piperina que é empregada como antiinflamatório; a vanila que tem aplicações antioxidantes; o pirebidil e a *L-dopa* que são agentes anti Parkinson. A síntese do piperonal, a partir do óleo essencial da pimenta longa (*Piper hispidinervum* C. DC), não gera um produto 100 % puro, dessa forma vê-se a importância de estudar uma maneira de separar o piperonal dos demais compostos, safrol, isosafrol e terpinoleno, também presentes no produto final da síntese. Dentre os métodos de purificação há a cromatografia líquida de alta eficiência, que ao longo do tempo mostrou-se eficaz na purificação e separação de diversos compostos. O método de separação baseada em cromatografia líquida de alta eficiência depende de diversos fatores, tais como a escolha da fase estacionária e da fase móvel, bem como estudos preliminares para a posterior implementação das variáveis definidas em uma escala semi preparativa ou preparativa. Na presente Dissertação a fase estacionária utilizada foi a sílica C₁₈ e a fase móvel uma mistura binária 70/30 (v/v) de etanol e água. A escolha da fase móvel binária deveu-se aos bons resultados de resolução obtidos entre o componente de interesse, o piperonal, e o safrol, isosafrol e terpinoleno. A resolução alcançada para o piperonal com relação aos demais componentes, safrol e isosafrol foi de 2,986 e para o terpinoleno 6,900, a literatura relata que valores acima de 1,5 representam uma completa separação. A estimativa de parâmetros chave para a coluna, como a porosidade da partícula e a fração de vazios do leito, foram obtidas por meio do método dos momentos e as isotermas de adsorção por análise frontal. As isotermas foram determinadas entre 20 e 35 °C, com passo de 5 °C, apresentaram uma configuração linear. De posse das isotermas, foi possível estimar os valores das constantes modificadas de Henry e as grandezas termodinâmicas ΔG , ΔH e ΔS para o sistema, por meio do gráfico de van't Hoff. Os valores de entalpia apontam que o piperonal é o composto menos retido, pois apresenta uma entalpia igual a -1,134 KJ mol⁻¹, o maior valor se comparado com os obtidos para o safrol, isosafrol e terpinoleno, o que demonstra a baixa interação com a fase estacionária, e consequentemente um baixo tempo de retenção do composto na coluna. Esse efeito foi comprovado com os resultados obtidos para a entropia, o piperonal foi o composto que apresentou o maior valor (6,812 J mol K⁻¹). Ao passo que o terpinoleno apresentou um valor igual a -6,485 J mol K⁻¹. Estes valores descrevem que a retenção do piperonal é menor se comparada com a retenção do terpinoleno. Essas distinções proporcionaram a separação entre os compostos.

Abstract

Piperonal (or heliotropine) presents industrial applications in the field of cosmetics as fragrance fixative, besides being the raw material for value-added components such as piperine which is employed as anti-inflammatory, vanilla which has antioxidants applications, piperidil and *L-dopa* which are anti Parkinson's disease. The synthesis of piperonal, from the *Piper hispidinervum* C. DC, does not generate 100% pure product, that way we can see the importance of studying a way to purify piperonal from the others compounds, safrole, isosafrole and terpinoleno, also presente in the final product of the synthesis. A method to be studied is high performance liquid chromatography, which has been proved as an effective in the purification and separation of various compounds. The separation method based on high performance liquid chromatography depends on several factors, such as the choice of stationary phase and mobile phase, as well as preliminary studies for further implementation of the defined variables in a semi-preparative or preparative scale. In the present study silica gel C₁₈ was used as stationary phase and mobile phase was a binary mixture 70/30 (v / v) ethanol and water, respectively. The choice of the binary mobile phase was due to the good results of resolution between the component of interest, piperonal, and others; safrole, isosafrole and terpinolene. The resolution achieved for piperonal in relation to other components, safrole and isosafrole was 2.986 and 6.900 for terpinoleno. The literature reports that values above 1.5 represent a complete separation. The estimation of key parameters for the column, such as the porosity of the particle and the bed porosity were obtained by the moment method and adsorption isotherms by frontal analysis. The isotherms determined between 20 and 35 ° C, with steps of 5 ° C showed a linear configuration. With the isotherms in hands, it was possible to estimate the values of the Henry constants and the thermodynamics parameters for the system through the van't Hoff graphical. The enthalpy values point out that piperonal is the less retained compound, because it shows an enthalpy value equal to -1.134 KJ mol⁻¹, the greater value if we compare to the safrol, isosafrol and terpinoleno values, this value demonstrate low interaction with the stationary phase and, consequently, a low retention time of the compound in the column. This effect was proved by the entropy values, piperonal showed the greater entropy (6.812 J mol K⁻¹). The terpinoleno showed a value equal to -6.485 J mol K⁻¹. These values describe that piperonal retention is smaller if we compare to terpinoleno retention. This difference makes possible the separation between the compounds.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	IX
RESUMO	XIII
ABSTRACT	XV
LISTA DE FIGURAS	XX
LISTA DE TABELAS	XXIV
NOMENCLATURA	XXVI
LETRAS LATINAS	xxvi
LETRAS GREGAS	xxvii
ABREVIACÕES.....	xxvii
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Apresentação do problema.....	1
1.2 Motivação para o trabalho	2
1.3 Objetivos	4
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	6
2.1 O piperonal: propriedades, derivados e rota de obtenção.....	6
2.2 Fundamentos da adsorção	8
2.2.1 Adsorção física e química.....	9
2.3 Análise termodinâmica da adsorção	10
Termodinâmica da adsorção	10
Isotermas de adsorção	14
Modelo linear	16
2.4 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência	18
2.5 Cromatografia líquida de fase reversa	20
2.5.1 Fase estacionária baseada em sílica	20

2.6	Técnicas em cromatografia.....	22
2.6.1	Métodos de obtenção de isothermas de adsorção.....	22
	Análise Frontal.....	22
2.6.2	Pulsos cromatográficos	24
2.7	Parâmetros cromatográficos.....	25
	Resolução.....	26
	Fator de retenção	27
	Seletividade	27
	Número de pratos	28
2.8	Fase móvel	28
3	MATERIAIS E MÉTODOS ...	30
3.1	Materiais	30
3.1.1	Padrões cromatográficos para os produtos de síntese do piperonal.....	30
3.1.2	Fase móvel.....	31
3.1.3	Componentes inertes.....	31
3.1.4	A fase estacionária	32
3.1.5	Equipamentos.....	32
3.2	Métodos.....	33
3.2.1	Determinação da fração de vazios do leito	33
3.2.2	Determinação da porosidade da partícula	34
3.2.3	Curva de calibração.....	35
3.2.4	A análise frontal.....	35
3.2.5	Otimização da fase móvel.....	36
4	RESULTADOS E DISCUSSÕES	37
4.1	Determinação da fração de vazios do leito e porosidade da partícula	37
4.1.1	Determinação da fração de vazios do leito	37

4.1.2	Determinação da porosidade da partícula	39
4.2	Testes preliminares para a determinação da fase móvel	41
4.2.1	A escolha da fase móvel.....	41
4.3	Análise frontal na determinação de isothermas com fase móvel 70/30 (v/v) etanol e água..	46
4.4	Isothermas lineares de adsorção com fase móvel 70/30 (v/v) etanol e água.....	57
4.5	Análise termodinâmica da adsorção	62
5	CONCLUSÕES E SUGESTÕES	67
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70
APÊNDICE A	82	
Análise frontal e isothermas de adsorção para fase móvel 100% etanol.....	82	
APÊNDICE B	87	
Curvas de calibração para o piperonal, safrol, isosafrol e terpinoleno.....	87	

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 – (a) canela de sassafrás; (b) pimenta longa.....	1
Figura 1.2 – Isomerização do safrol aos isômeros do isosafrol (<i>cis-trans</i> -isosafrol) BAUER <i>et al.</i> , 2002 <i>apud</i> BRAGA, 2007).....	3
Figura 1.3 – Oxidação eletroquímica do <i>cis-trans</i> -isosafrol a isosafrol glicol para posterior oxidação eletroquímica para piperonal (TORII <i>et al.</i> , 1984 <i>apud</i> BRAGA, 2007).....	3
Figura 1.4 – Estrutura química do terpinoleno.....	3
Figura 2.1– (a) Estrutura química do safrol; (b) Estrutura química do piperonal.....	6
Figura 2.2 – Substâncias sintetizadas a partir do piperonal (SANTOS <i>et al.</i> 2004).....	7
Figura 2.3 – Modelos de isotermas de adsorção (adaptada de BRUNAUER <i>et al.</i> , 1940).....	15
Figura 2.4 – Representação esquemática de um equipamento CLAE padrão: 1 – Reservatório de fase móvel; 2 – Bomba; 3 – Coluna cromatográfica; 4 – Detector; 5 – Resíduo (Adaptada de JARDIM, COLLINS e GUIMARÃES, 2006).....	19
Figura 2.5 – Representação esquemática de uma curva de ruptura (adaptado de GRITTI <i>et al.</i> , 2003).....	23
Figura 2.6 – Cromatograma resultante para a injeção de uma amostra contendo três componentes distintos (adaptada de SCHULTE e EPPING, 2005).....	25
Figura 3.1 – (a) Estrutura química do uracil; (b) Estrutura química do poliestireno.....	32
Figura 3.2 – Representação esquemática de um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (adaptada de NASCIMENTO, 2012).....	33
Figura 4.1 – Cromatograma resultante para a injeção de 20 µL de poliestireno 0,5g L ⁻¹ . Fase móvel THF, T. 25°C, vazão 1 mL min ⁻¹ , 220 nm.....	38

Figura 4.2 – Primeiro momento para o composto poliestireno. Fase móvel THF, 220 nm.....	38
Figura 4.3 – Cromatograma resultante para a injeção de 20 µL de uracil 0,5g L ⁻¹ . Fase móvel 60/40 (v/v) acetonitrila/água, T. 25°C, vazão 1 mL min ⁻¹ , 254 nm.....	39
Figura 4.4 – Primeiro momento para o composto uracil. Fase móvel 60/40 (v/v) acetonitrila/ água. 254 nm.....	40
Figura 4.5 – Cromatograma resultante para a injeção de 20 µL da solução de piperonal, safrol, isosafrol, safrol e terpinoleno. Fase móvel etanol. 230 nm.....	41
Figura 4.6 – Cromatograma resultante para a injeção de 20 µL da solução de piperonal, safrol, isosafrol, safrol e terpinoleno. Fase móvel 90/10 etanol/água.....	42
Figura 4.7 – Cromatograma resultante para a injeção de 20 µL da solução de piperonal, safrol, isosafrol, safrol e terpinoleno. Fase móvel 85/15 etanol/água.....	43
Figura 4.8 – Cromatograma resultante para a injeção de 20 µL da solução de piperonal, safrol, isosafrol, safrol e terpinoleno. Fase móvel 80/20 etanol/água.....	44
Figura 4.9 – Cromatograma resultante para a injeção de 20 µL de piperonal, safrol, isosafrol e terpinoleno. Fase móvel 70/30 etanol/água.....	45
Figura 4.10 – Curva de ruptura para o piperonal à 20 °C.....	47
Figura 4.11 – Curva de ruptura para o safrol à 20 °C.....	47
Figura 4.12 – Curva de ruptura para o isosafrol à 20 °C.....	48
Figura 4.13 – Curva de ruptura para o terpinoleno à 20 °C.....	48
Figura 4.14 – Curva de ruptura para a mistura à 20 °C.....	49
Figura 4.15 – Curva de ruptura para o piperonal à 25 °C.....	49
Figura 4.16 – Curva de ruptura para o safrol à 25 °C.....	50

Figura 4.17 – Curva de ruptura para o isosafrol à 25 °C.....	50
Figura 4.18 – Curva de ruptura para o terpinoleno à 25 °C.....	51
Figura 4.19 – Curva de ruptura para a mistura à 25 °C.....	51
Figura 4.20 – Curva de ruptura para o piperonal à 30 °C.....	52
Figura 4.21 – Curva de ruptura para o safrol à 30 °C.....	52
Figura 4.22 – Curva de ruptura para o isosafrol à 30 °C.....	53
Figura 4.23 – Curva de ruptura para o terpinoleno à 30 °C.....	53
Figura 4.24 – Curva de ruptura para a mistura à 30 °C.....	54
Figura 4.25 – Curva de ruptura para o piperonal à 35 °C.....	54
Figura 4.26 – Curva de ruptura para o safrol à 35 °C.....	55
Figura 4.27 – Curva de ruptura para o isosafrol à 35 °C.....	55
Figura 4.28 – Curva de ruptura para o terpinoleno à 35 °C.....	56
Figura 4.29 – Curva de ruptura para a mistura à 35 °C.....	56
Figura 4.30 – Isoterma de adsorção para o piperonal; safrol; isosafrol; terpinoleno e mistura à 20°C.....	57
Figura 4.31 – Isoterma de adsorção para o, piperonal; safrol; isosafrol; terpinoleno e mistura à 25°C.....	58
Figura 4.32 – Isoterma de adsorção para o, piperonal; safrol; isosafrol; terpinoleno e mistura à 30°C.....	59
Figura 4.33 – Isoterma de adsorção para o, piperonal; safrol; isosafrol; terpinoleno e mistura à 35°C.....	60

Figura 4.34 – Relação da seletividade com a temperatura.....	61
Figura 4.35 – Gráfico de van't Hoff para os compostos estudados.....	62
Figura 4.36 – Gráfico de van't Hoff em função da seletividade e temperatura.....	65
Figura A.1 – Curva de ruptura para o piperonal à 25°C.....	83
Figura A.2 – Curva de ruptura para o safrol à 25°C.....	83
Figura A.3 – Curva de ruptura para o isosafrol à 25°C.....	84
Figura A.4 – Curva de ruptura para o terpinoleno à 25°C.....	84
Figura A.5 – Isotermas de adsorção para o piperonal, safrol, isosafrol e terpinoleno.....	86
Figura B.1 – Curva de calibração para o piperonal.....	87
Figura B.2 – Curva de calibração para o safrol.....	88
Figura B.3 – Curva de calibração para o isosafrol.....	88
Figura B.4 – Curva de calibração para o terpinoleno.....	89

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1 – Composição química média dos produtos de síntese do piperonal.....	4
Tabela 2.1 – Modelos de isotermas.....	17
Tabela 2.2 – Principais fases estacionárias empregadas na cromatografia líquida de partição operando no modo reverso (RP) (LANÇAS, 2009).....	21
Tabela 3.1 – Composição química média dos produtos da síntese do piperonal Braga (2007).....	30
Tabela 4.1 – Tempo morto para o sistema cromatográfico determinado com a injeção de poliestireno e uracil ($0,5\text{g L}^{-1}$) no sistema CLAE.....	37
Tabela 4.2 – Relação da resolução entre o piperonal e o safro-isosafrol e terpinoleno, FM 90/10 (v/v) de etanol e água.....	43
Tabela 4.3 – Relação da resolução entre o piperonal, safrol/isosafrol e terpinoleno. FM 85/15 (v/v) de etanol e água.....	44
Tabela 4.4 – Relação da resolução entre o piperonal, safrol, isosafrol e terpinoleno. FM 80/20 (v/v) de etanol e água.....	45
Tabela 4.5 – Relação da resolução entre o piperonal, safrol/isosafrol e terpinoleno, FM 70/30 (v/v) de etanol e água.....	46
Tabela 4.6 – Constantes modificadas de Henry para os compostos estudados à 20°C, FM 70/30 (v/v) etanol e água.....	58
Tabela 4.7 – Constantes modificadas de Henry para os compostos estudados à 25°C, FM 70/30 (v/v) etanol e água.....	59
Tabela 4.8 – Constantes modificadas de Henry para os compostos estudados à 30°C, FM 70/30 (v/v) etanol e água.....	60
Tabela 4.9 – Constantes modificadas de Henry para os compostos estudados à 35°C, FM 70/30 (v/v) etanol e água.....	61

Tabela 4.10 – Dados termodinâmicos obtidos para os compostos piperonal, safrol, isosafrol, terpinoleno e mistura.....63

Tabela 4.11 – Dados termodinâmicos obtidos por meio da seletividade entre os compostos e o piperonal.....66

Tabela A.1 – Constantes modificadas de Henry para o piperonal, safrol, isosafrol e terpinoleno em fase móvel 100% etanol.....86

Tabela B.1 – Coeficientes angulares e de determinação das curvas de calibração para os produtos da síntese do piperonal.....89

NOMENCLATURA

LETRAS LATINAS

a	Parâmetro da isoterma de adsorção na Equação 2.2
b	Expoente de adsorção da Equação 2.3
b	Parâmetro das isotermas de adsorção nas Equações 2.2 e 2.4.....L g ⁻¹
c	Concentração do soluto na fase móvel.....g L ⁻¹
D_{AB}^o	Coeficiente livre de difusão.....cm ² min ⁻¹
D_L	Coeficiente de dispersão axial.....cm ² min ⁻¹
d_p	Diâmetro das partículas.....cm
D_p	Difusividade no poro.....cm ² min ⁻¹
E_b	Coeficiente de dispersão axial.....cm ² min ⁻¹
$HETP$	Altura equivalente a um prato teórico
k, k_i, k_j	Fator de retenção
K_F	Constante na Equação 2.3
K_p	Constante modificada de Henry
L_c	Altura do leito.....cm
N	Número de pratos
q	Capacidade de saturação da coluna.....g L ⁻¹
R_s	Resolução
T	Temperatura.....°C, K
t_0	Tempo morto da coluna.....min
t_{plant}	Tempo morto da planta cromatográfica.....min
t_{Ri}	Tempo de retenção do composto imin
t_{total}	Tempo morto total.....min
t'_{Ri}	Tempo de retenção corrigido do composto imin
u_0	Velocidade superficial.....cm min ⁻¹
V	Volume da coluna vazia.....cm ³
V_a	Volume de adsorvente.....cm ³
V_{b_A}	Volume molar do soluto.....cm ³ mol ⁻¹
V_{b_B}	Volume molar do solvente.....cm ³ mol ⁻¹
V_F	Volume de retenção no ponto de inflexão.....cm ³
V_M	Volume morto do sistema.....cm ³
w_h	Largura do pico a meia altura.....cm

ΔG	Varição da energia livre de Gibbs.....J mol ⁻¹
ΔH	Entalpia molar de adsorção.....KJ mol ⁻¹
ΔS	Entropia molar de adsorção.....J mol ⁻¹

LETRAS GREGAS

ν	Viscosidade cinemática.....cm ² s ⁻¹
μ	Primeiro momento, nas Equações 2.39 e 2.41.....min
μ_B	Viscosidade cinemática, na Equação 2.38.....g m ⁻¹ s ⁻¹
α	Fator de separação ou seletividade
ε	Porosidade do leito
ε_p	Porosidade da partícula
ε_T	Porosidade total
λ	Comprimento de onda.....nm
σ^2	Segundo momento
Φ	Relação de fases.....cm ³

ABREVIações

AF	Análise frontal
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
FM	Fase móvel
LSC	Limite superior de controle
LIC	Limite inferior de controle
<i>HETP</i>	<i>Height of an equivalent theoretical plate</i>
<i>RPLC</i>	<i>Reversed phase liquid chromatography</i>
THF	Tetraidrofurano
Uv-Vis	Ultravioleta e visível

Capítulo 1

1 Introdução

1.1 Apresentação do problema

As espécies do gênero *Piper* são utilizadas em medicamentos populares como agentes antibacterial e antifúngico. Tais efeitos podem ser observados devido à presença do óleo essencial nas plantas deste gênero (Sauter *et al.*, 2012). O óleo essencial da pimenta longa (*Piper hispidinervum* C. DC) apresenta alto teor de safrol, ao redor de 90%. De acordo com Bizzo *et al.* (2001); Cremasco e Braga (2012) e Sauter *et al.* (2012) a importância comercial do óleo da *P. hispidinervum* reside no alto teor de safrol contido no mesmo, pois o safrol é matéria prima para o piperonal ou heliotropina (3,4-metilenodioxibenzaldeído). O piperonal possui aplicações na indústria de cosméticos como fixador de fragrâncias, além de ser substrato para produtos de maior valor agregado na indústria farmacêutica (COSTA, 1999; CREMASCO e BRAGA, 2012).

Em escala industrial o piperonal é obtido em um processo baseado em ozonólise do *cis-trans*-isosafról. Este processo demanda uma elevada quantidade de energia, e tem a desvantagem de poder gerar compostos indesejáveis (BRAGA, 2007). Outra maneira de obtenção do piperonal em escala industrial é realizando a oxidação química do isosafról. Um processo que foi utilizado em larga escala usava o cromo (VI) como oxidante, no entanto tal processo foi considerado insatisfatório, devido ao risco de poluição ambiental do cromo hexavalente (GRIMSHAW e HUA, 1993).

Com o desuso da prática de oxidação química, teve-se início uma nova forma de obter o piperonal, que foi através dos óleos essenciais da canela de sassafrás (*Ocotea pretiosa* (Ness) Mez), Figura 1.1a, ou da pimenta longa (*P. hispidinervum*), Figura 1.1b, pois os óleos são ricos em safrol, que como citado anteriormente, é a matéria prima para o piperonal.



Figura 1.1– (a) canela de sassafrás; (b) pimenta longa.

Até o início da década de 1990, o Brasil era o principal exportador a nível mundial de safrol (Figura 1.2). O safrol produzido no Brasil provinha do óleo de sassafrás, que era produzido pelo arraste a vapor do tronco e lenho da *O. pretiosa*, uma planta da espécie Lauráceae, abundante na região do vale do rio Itajaí-Açu, no estado de Santa Catarina (COSTA, 1999; CREMASCO e BRAGA, 2010). Devido à exploração da *O. pretiosa* colocar em risco as reservas naturais da planta, em 1991 o Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) proibiu a exploração da mesma. Dessa forma o Brasil passou de exportador a importador de safrol. Viu-se na pimenta longa uma alternativa viável como substituição da canela de sassafrás e assim, tentar suprir a demanda do produto no mercado (CREMASCO e BRAGA, 2010).

Devido às características do óleo da pimenta longa, alta concentração de safrol, ele permite a síntese orgânica do piperonal. Cremasco e Braga (2012) realizaram a síntese orgânica do piperonal diretamente do óleo essencial da pimenta longa, por meio da oxidação eletroquímica dos isômeros *cis-trans*-isosafról a isosafról glicol e posterior oxidação para piperonal. Os autores obtiveram um rendimento em piperonal de 85% (Figura 1.3).

Alguns autores apresentaram maneiras diferentes de se obter o piperonal a partir do safrol ou isosafról. Alvarez e colaboradores (2006) utilizaram a oxidação do isosafról com solvente iodobenzeno diacetato em zeolitas Y sob radiação de micro-ondas, os autores obtiveram com este processo uma conversão do isosafról a piperonal na ordem de 91%.

Santos e colaboradores (2004) optaram pela produção do piperonal a partir da oxidação catalisada por peroxidase microbológica do isosafról, resultando em um conversão final na ordem de 20% do isosafról inicial em piperonal.

De acordo com o que foi apresentado, vê-se a necessidade de estabelecer uma técnica de purificação do produto resultante, isentando o mesmo de contaminantes e elevando a maior concentração de piperonal possível. A alternativa estudada nesta Dissertação está embasada na cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), utilizando a sílica C₁₈ como fase estacionária. O intuito do trabalho é avaliar a resposta dos analitos em uma combinação de fases móveis visando uma ampliação da escala de separação do piperonal e analisar o comportamento de cada composto, concluindo assim se a separação via CLAE é ou não possível.

1.2 Motivação para o trabalho

A motivação do trabalho residiu em separar os componentes presentes no produto da síntese do piperonal (3,4-metilenodioxibenzaldeído), obtendo assim uma substância com um maior grau de pureza e consequentemente maior valor agregado. Os produtos presentes na síntese foram relatados por Braga (2007) como sendo, terpinoleno (4-isopropilideno-1-metilciclohexeno), safrol (3,4-metilenodioxifenil-2-propeno) e isosafról (3,4-metilenodioxifenil-1-propeno).

A rota utilizada por Braga (2007) está representada nas Figuras (1.2) e (1.3). A Figura (1.2) ilustra a isomerização do safrol para seu isômero estável correspondente, isosafról.

Tradicionalmente as reações de isomerização dos alilbenzenos são catalisadas por álcalis, como o KOH, em soluções alcoólicas em altas temperaturas (BRAGA, 2007). A Figura (1.3) representa a etapa de da oxidação eletroquímica do *cis-trans*-isosaftrol a isosaftrol glicol, para uma posterior oxidação a piperonal.

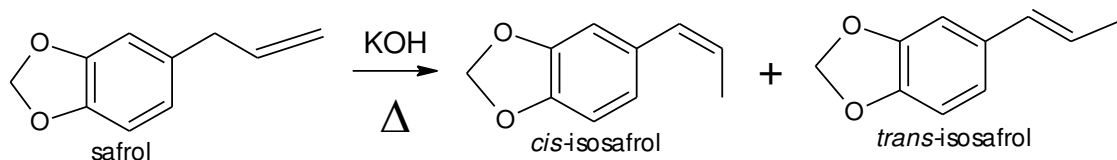


Figura 1.2 – Isomerização do safrol aos isômeros do isosaftrol (*cis-trans*-isosaftrol) BAUER *et al.*, 2002 *apud* BRAGA, 2007).

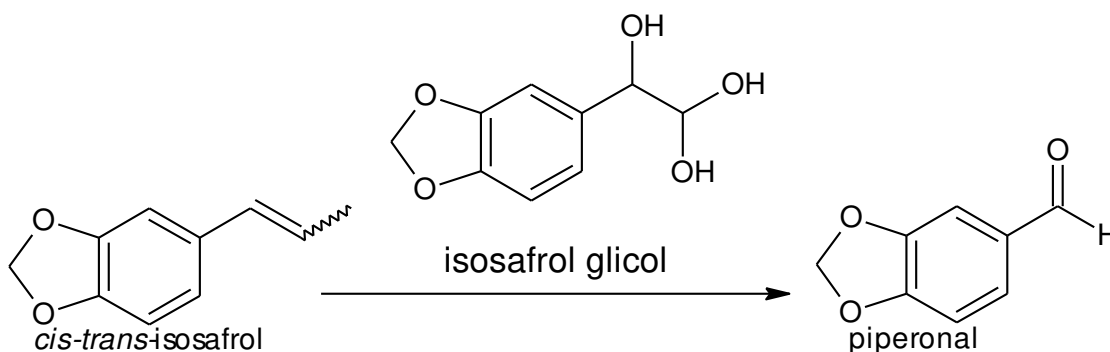


Figura 1.3 – Oxidação eletroquímica do *cis-trans*-isosaftrol a isosaftrol glicol para posterior oxidação eletroquímica para piperonal (TORII *et al.*, 1984 *apud* BRAGA, 2007).

Braga (2007) obteve um rendimento médio, em conversão a piperonal, na faixa de 85%.

Como mencionado, o terpinoleno foi um dos compostos encontrados por Braga (2007) no produto final da síntese do piperonal. Sua estrutura química está representada na Figura (1.4).

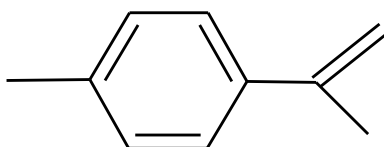


Figura 1.4 – Estrutura química do terpinoleno

A Tabela (1.1) relata que nem todo o safrol e *cis-trans*-isosaftrol presentes no óleo foram convertidos a piperonal.

Tabela 1.1 – Composição química média dos produtos de síntese do piperonal.

Compostos	c (mg mL ⁻¹)	% Sorbato
Terpinoleno	3,741 x 10 ⁻⁶	0,9
Safrol	7,091 x 10 ⁻⁶	1,7
<i>Cis-trans</i> -Isosafrol	3,166 x 10 ⁻⁵	7,6
Isosafrol glicol	0	0
Piperonal	3,548 x 10 ⁻⁴	84,9
Outros ^(a)	2,044 x 10 ⁻⁵	4,9

^(a) Compostos não identificados

Devido à utilização do piperonal, já relatada, a presente Dissertação fundamentou-se em determinar as melhores condições dentro do método de cromatografia líquida de alta eficiência para a separação do composto de interesse, piperonal, dos demais presentes na síntese do mesmo.

1.3 Objetivos

A presente Dissertação de Mestrado tem por objetivo principal o estudo da separação do piperonal dos demais componentes presentes na síntese orgânica do mesmo, ou seja, a separação do piperonal do safrol, *cis-trans*-isosafrol e terpinoleno. Para tal, foi utilizado o estudo, além dos parâmetros cromatográficos seletividade e resolução, os parâmetros termodinâmicos (ΔG , ΔH e ΔS), que advém do estudo da região linear das isotermas de adsorção. As propriedades da coluna, como a fração de vazios do leito e a porosidade da partícula, parâmetros chave para a obtenção das isotermas, foram obtidos por meio do método do primeiro momento. Todo o trabalho foi conduzido por meio da técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e utilizou-se da sílica C₁₈, como fase estacionária, em assim sendo, utilizou-se a cromatografia líquida de fase reversa, que permite uma maior recuperação dos solutos e solventes utilizados. A principal fase móvel utilizada nesta Dissertação era composta por uma mistura binária 70/30 (v/v) etanol e água. O estudo foi conduzido em uma faixa de temperatura, entre 20 e 25 °C, com passo de 5 °C, isso possibilitou a obtenção das constantes modificadas de Henry para cada composto, e assim, avaliar o efeito da temperatura sobre a retenção de cada componente na coluna, bem como, traçar o gráfico de van't Hoff, que permite a obtenção direta das grandezas termodinâmicas.

Para atingir o objetivo principal traçaram-se as seguintes metas:

- determinação dos tempos de retenção do piperonal, safrol, isosafrol e terpinoleno, na coluna para, assim efetuar o cálculo da resolução;

- escolha da fase móvel mais adequada para a separação do piperonal dos demais constituintes; safrol, isosafrol e terpinoleno;
- determinação da fração de vazios da coluna e da porosidade da partícula;
- determinação das constantes modificadas de Henry (K_p) e das isotermas de adsorção;
- traçar o gráfico de van't Hoff, para a determinação das grandezas termodinâmicas, ΔG , ΔH e ΔS .

Capítulo 2

2 Revisão bibliográfica

2.1 O piperonal: propriedades, derivados e rota de obtenção

O óleo essencial da *Piper hispidinervum* C. DC, em seu estado bruto, apresenta elevada concentração de safrol (Figura 2.1a), aproximadamente 90%. O óleo é extraído das folhas e talos finos da planta por meio, convencionalmente, de um processo de hidrodestilação. O mesmo procedimento é utilizado no campo, utilizando-se indistintamente galhos e folhas (COSTA, 1999; CREMASCO e BRAGA, 2010).

O óleo essencial de pimenta longa possui valor medicinal e ação inseticida. Além disso, é utilizado no tratamento de doenças venéreas, desordens intestinais, males genito-urinário e também é apontado no auxílio ao reumatismo, conforme relatos populares. Testes *in vivo* realizados com pomada à base do óleo essencial da pimenta longa demonstraram atividade no tratamento de lesões cutâneas (JARDIM, 2011).



Figura 2.1– (a) Estrutura química do safrol; (b) Estrutura química do piperonal.

O safrol, principal composto do óleo essencial da pimenta longa, é um componente químico aromático utilizado na indústria como matéria-prima, entre outras, na manufatura da heliotropina ou piperonal (Figura 2.1b), que é fixador de fragrâncias e do butóxido de piperonila (agente sinérgico encontrado nos inseticidas e pesticidas naturais à base de piretrium) (BRAGA, 2007). Devido a grande importância do safrol como matéria prima para inúmeras indústrias, estudos resultaram no conhecimento da reatividade deste sistema (alilbenzeno), de tal maneira que todos os átomos de carbono desta substância natural podem ser, eficiente e regioseletivamente, funcionalizados (BARREIRO e FRAGA, 1999; BRAGA, 2007)

O processo para a obtenção do piperonal mais utilizado industrialmente é a ozonólise ou oxidação com ácido crômico (DAVIES e HODGSON, 1943) a partir do isosafrol. Entretanto, a

poluição ambiental associada a espécies de cromo e a necessidade de uma grande quantidade de eletricidade e controle cuidadoso da temperatura de reação (0-5 °C) para a ozonólise, impulsionou o desenvolvimento de novas rotas sintéticas bem como novos processos menos poluentes e mais viáveis economicamente (FARINACCI, 1957; TORII *et al.*, 1984). Ou seja, a rota de obtenção do piperonal caracteriza-se pela isomerização do safrol a *cis-trans*-isosafról e uma posterior eletrooxidação a isosafról glicol e, por fim uma oxidação para piperonal. Braga (2007) demonstrou ser possível obter os isômeros *cis-trans*- isosafról a partir do óleo essencial da pimenta longa (*Piper hispidinervum* C. DC). O rendimento em piperonal obtido pelos autores foi na ordem de 85%.

Santos *et al.* (2004) reportaram a obtenção de piperonal por meio da oxidação catalisada por peroxidase microbiológica do isosafról em piperonal, levando a uma conversão na faixa de 20%.

A importância do piperonal reside em suas aplicações industriais, como fixador de fragrâncias e, devido o mesmo ser substrato para a formulação de outros produtos com maior valor agregado, podendo-se citar a piperina, empregada como antiinflamatório; a vanilina, como antioxidante, o piribedil e a *L-dopa*, como agentes anti-Parkinson; e a eupaverina, usada como vaso dilatador (SANTOS *et al.*, 2004).

A Figura (2.2) representa a estrutura química de alguns dos produtos que derivam do piperonal e que originam produtos de alto valor agregado.

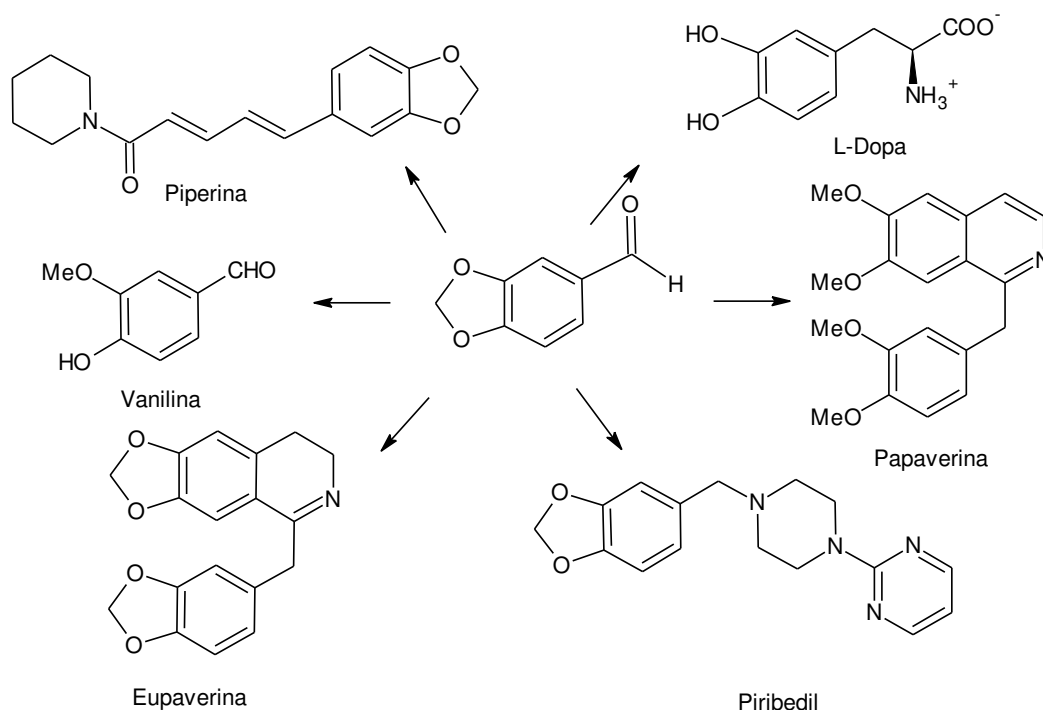


Figura 2.2 – Substâncias sintetizadas a partir do piperonal (SANTOS *et al.*, 2004).

2.2 Fundamentos da adsorção

A adsorção é um fenômeno que envolve a transferência de massa e a distribuição de um equilíbrio resultante para um ou mais solutos distribuídos em uma fase fluida (fase móvel) e uma fase sólida (fase estacionária). O fracionamento de um único soluto entre a fase fluida e o adsorvente ou a seletividade da fase estacionária para múltiplos solutos torna possível a separação de diferentes compostos distribuídos em uma solução. (LEVAN, CARTA e YON, 1997).

A aplicação técnica da adsorção cobre ampla faixa, tais como processos de separação, sínteses, purificação de gases e líquidos. Os processos de adsorção se consolidaram na indústria como sendo uma alternativa para a purificação de diversos componentes. Seu uso é vasto devido à variedade de adsorventes encontrada no mercado, tais como sílicas de fase reversa, e novas técnicas cromatográficas (LEVAN, CARTA e YON, 1997; MEYER, 2004).

O fenômeno de adsorção pode ser utilizado na purificação e separação de compostos pois promove acúmulo de um soluto na interface de um adsorvente. O soluto distribui-se seletivamente entre as fases envolvidas. O acúmulo do soluto por unidade de área é pequeno, por isso, adsorventes com alta porosidade e microporosidade, como o carvão ativado, que possui uma área superficial interna, entre 600 e 1000 m² g⁻¹ são usados. Os adsorventes podem ser materiais naturais ou sintéticos de estrutura amorfa ou microcristalina. Todo o processo de transferência de massa na adsorção é influenciado pela configuração do adsorvente, pois a difusão efetiva leva em conta a porosidade e a tortuosidade do adsorvente (LEVAN, CARTA e YON, 1997; STRAND, 2001).

Dentro da adsorção uma técnica que tem destaque é a cromatografia, que é baseada no depósito ou acúmulo de moléculas em uma dada superfície adsorvente. De acordo com a natureza das moléculas e a superfície adsorvente o processo pode ser dividido em várias formas, como por exemplo, adsorção de moléculas gasosas em superfície sólida; moléculas líquidas em superfície sólida. Tais divisões caracterizam a cromatografia gasosa, cromatografia líquida e cromatografia planar (SCHULTE e EPPING, 2005).

Em nível molecular, o fenômeno da adsorção refere-se à formação de forças de ligação entre a superfície e as moléculas na fase líquida. A diferença nas forças de ligação pode ser de natureza distinta, por isso o balanço energético das forças de ligação pode ser muito diferente entre si. Basicamente, dois tipos de forças podem ser observadas: as forças físicas e as forças químicas (SCHULTE e EPPING, 2005; ATKINS e de Paula, 2006).

As forças envolvidas na adsorção física incluem as forças de van der Waals (dispersão-repulsão) e as forças eletrostáticas compreendendo polarização, dipolo e interações quadrupolo. A contribuição da força de van der Waals está sempre presente, enquanto as contribuições eletrostáticas são significativas apenas nos casos de adsorventes como zeólitas, que possuem uma estrutura iônica (RUTHVEN, 1984).

2.2.1 Adsorção física e química

A adsorção depende da existência de uma força na superfície da fase sólida que reduza a energia potencial da molécula adsorvida, para uma força menor que a força da fase líquida. Usualmente são diferenciadas duas classes de adsorção, a fisissorção e a quimissorção, tal distinção depende da natureza das forças envolvidas na superfície do adsorvente. A adsorção física ou fisissorção é conhecida como um processo de ligação reversível da molécula presente na fase fluida e a fase estacionária. As forças envolvidas na fisissorção consistem em dispersão-repulsão, que é à base da fisissorção, tal força é suplementada por contribuições eletrostáticas (polarização, dipolo, quadrupolo elétrico permanente ou uma rede de carga elétrica). Tais forças são importantes, ou até mesmo, dominantes para adsorventes polares (STRAND, 2001; RUTHVEN, 2008).

Os modelos de adsorção física dependem fundamentalmente da temperatura. Em geral, a elevação de temperatura provoca diminuição da capacidade de adsorção, devido ao aumento de entropia na camada do adsorvente, ocasionado pela dessorção do sorbato (NASSAR e MAGDY, 1997).

A quimissorção envolve ligações químicas entre o adsorbato e o adsorvente (geralmente dissociação). As forças envolvidas na quimissorção são muito mais fortes se comparada com as forças envolvidas na fisissorção e envolvem a transferência ou compartilhamento de elétrons, para que haja a ligação química. Outro ponto a ser mencionado é a irreversibilidade do processo, pois em se tratando de separação de componentes, não é interessante que ocorra irreversibilidade ou dissociação (LEVAN, CARTA e YON, 1997; SCHULTE e EPPING, 2005; RUTHVEN, 2008).

As distinções entre a adsorção física e química podem ser observadas a seguir (RUTHVEN, 1984; SCHWANKE, 2003; SCHULTE e EPPING, 2005):

- a) a adsorção física é, em geral, um fenômeno com menor grau de especificidade, enquanto a adsorção química é altamente dependente da afinidade entre o adsorvente e a molécula a ser adsorvida;
- b) uma molécula que passa por uma adsorção física mantém a sua identidade, ou seja, na dessorção ela retornará para a fase móvel com sua estrutura original, ao passo que uma molécula que passa pelo processo de quimissorção pode sofrer uma dissociação e com isso não retornará a sua forma original na dessorção;
- c) a energia na quimissorção é da mesma ordem e grandeza da energia de uma reação química comparável. A adsorção física é sempre exotérmica e a energia geralmente não é maior que a energia de condensação da molécula a ser adsorvida, entretanto. Tal energia apresenta um leve incremento quando à adsorção física ocorre nos poros muito estreitos do adsorvente.

Em cromatografia líquida, ocorre usualmente adsorção física, principalmente quando o objetivo é separar componentes presentes em uma amostra. A adsorção física ainda apresenta

uma redução substancial na capacidade de adsorção nos sítios ativos do adsorvente, além de ser um processo mais demorado (GREGG e SING, 1982).

2.3 Análise termodinâmica da adsorção

Termodinâmica da adsorção

O estudo do equilíbrio termodinâmico pode, em geral, ser aplicado à adsorção como para qualquer outro equilíbrio entre fases. A única suposição geral implícita em tal aproximação é que a camada adsorvida pode ser tratada como uma fase distinta no sentido termodinâmico. É possível adotar duas formas diferentes, mas de perspectivas inteiramente consistentes quando se aplica os princípios termodinâmicos ao equilíbrio de adsorção. Um das formas é: a camada superficial, que consiste de adsorvente mais adsorbato, pode ser considerada como uma única fase, tendo as mesmas propriedades gerais de uma solução; a outra forma de se considerar é o adsorvente sendo termodinamicamente inerte (RUTHVEN, 1984).

A termodinâmica da adsorção é um tópico importante dentro da cromatografia, devido a sua ampla utilização na área de fármacos e estudos de compostos variados. Diversos autores utilizaram a técnica para dar melhor entendimento quanto ao mecanismo de retenção cromatográfica (ROSA, 2005; SILVA JUNIOR, 2006; GÖTMAR, 2007; CHEN *et al.*, 2008; FREITAS, 2009; NASCIMENTO, 2012).

A maneira mais usual de conduzir um estudo termodinâmico em cromatografia é a variação da temperatura de trabalho e, com isso, obter as constantes modificadas de Henry em diversas temperaturas. A dependência do logaritmo natural dos fatores de retenção e da seletividade com o inverso da temperatura são rotineiramente usadas para a determinação das grandezas termodinâmicas (RUTHVEN, 1984; ATKINS e de Paula, 2006; DIAS, 2007).

Geralmente, um aumento da temperatura de trabalho da coluna produz duas consequências: (a) diminuição do tempo de retenção dos analitos; (b) aumento na eficiência da coluna, por meio do incremento do número de pratos. Outra consequência do aumento da temperatura é a redução da viscosidade da fase móvel, o que permite trabalhar com vazões mais altas, devido à relação da viscosidade, vazão e pressão (BERTHOD, HE e BEESLEY, 2004).

Ruthven (1984) descreve que o equilíbrio termodinâmico da adsorção é igual a qualquer outro equilíbrio termodinâmico, ou seja, uma igualdade entre potenciais químicos.

Blandamer e colaboradores (1998) apresentaram que o equilíbrio de adsorção, para moléculas adsorvidas, j , em soluções aquosas, cujos sítios ativos do adsorvente estavam previamente ocupados por água, pode ser representado pela Equação (2.1).



onde (aq) e (ad) representam a fase aquosa e o adsorvente, respectivamente. O potencial químico das moléculas adsorvidas, j , pode ser arranjado na forma da Equação (2.2) (RAMESH *et al.*, 1998).

$$\mu_j(aq) = \mu_j^0(aq) + RT[\ln(f(\theta))] \quad (2.2)$$

em que f é a função do grau de ocupação da superfície do adsorvente, θ . O potencial químico do adsorbato, j , em solução aquosa pode ser escrito na forma da Equação (2.3).

$$\mu_j(aq) = \mu_j^0(aq) + RT \left[\ln \left(\frac{C_e \gamma_j(aq)}{C_r} \right) \right] \quad (2.3)$$

em que C_e e $\gamma_j(aq)$ são a concentração molar do soluto e o coeficiente de atividade, respectivamente. E $C_r = 1 \text{ mol L}^{-1}$. No estado de equilíbrio os potenciais químicos se igualam como apresentado na Equação (2.4).

$$\mu_j(ad) = \mu_j(aq) \quad (2.4)$$

Desta maneira, a variação na energia livre de Gibbs pode ser escrita como demonstrada na Equação (2.5) (BLANDAMER *et al.*, 2005).

$$\Delta G = \mu_j(ad) - \mu_j^0(aq) = -RT \left[\ln \left(\frac{f(\theta)C_r}{C_e \gamma_j(aq)} \right) \right] = -RT \ln K_p \quad (2.5)$$

em que K_p representa a constante de equilíbrio termodinâmico, também conhecida como constante modificada de Henry, T é a temperatura absoluta e R a constante universal dos gases ideais.

Reagrupando a Equação (2.5) em função da constante modificada de Henry, K_p , chega-se a equação clássica de van't Hoff, que está representada pela Equação (2.6).

$$\Delta G = -RT \ln K_p \quad (2.6)$$

Se considerarmos a relação entre ΔG e K_p , na Equação (2.5), a mudança da constante modificada de Henry com a temperatura pode ser obtida na forma diferencial, como pode ser observado na Equação (2.7).

$$\frac{d \ln K_p}{dT} = \frac{\Delta H}{RT^2} \quad (2.7)$$

A forma integrada da Equação (2.7) é apresentada na Equação (2.8).

$$\ln K_p = -\frac{\Delta H}{RT} + y \quad (2.8)$$

em que y representa a constante de integração. De acordo com Saha e Chowdhuy (2011), a variação da entropia é igual a constante universal dos gases ideais multiplicada pela constante de integração da Equação (2.8). Desta forma, reagrupando e substituindo a Equação (2.6) e Equação (2.8), chega-se a Equação (2.9), que é a equação clássica e fundamental da energia livre de Gibbs (TRATHNIGG e VERONIK, 2005).

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (2.9)$$

Igualando as Equações (2.6) e (2.9), obtêm-se a Equação (2.10).

$$\ln K_p = -\frac{\Delta G}{RT} = -\frac{\Delta H}{RT} + \frac{\Delta S}{R} \quad (2.10)$$

Por meio da Equação (2.10) é possível construir um gráfico de $\ln K_p$ contra $1/T$ que resulta em $-\Delta H/R$ igual ao coeficiente angular e $\Delta S/R$ igual ao coeficiente linear. Isso proverá os valores de ΔH e ΔS para a adsorção. O gráfico de $\ln K_p$ contra $1/T$ é conceitualmente conhecido como gráfico de van't Hoff e seu comportamento é linear para uma grande faixa de concentração e pressão de trabalho (RUTHVEN, 1984; SCHLAUCH e FRAHM, 2001; TRATHINGG e VERONIK, 2005).

A Equação (2.10) ainda pode ser representada com o fator de retenção, k_i , em vez de K_p , sendo necessária a adição da relação de fases (Φ), como representado na Equação (2.11) (SEIDEL-MORGENSTERN e GUIOCHON, 1993; SCHLAUCH e FRAHM, 2001; NASCIMENTO *et al.*, 2012).

$$\ln k = -\frac{\Delta H}{RT} + \frac{\Delta S}{R} + \ln \Phi \quad (2.11)$$

em que k representa o fator de retenção de um dado composto na coluna, ao passo que o K_p é uma medida de equilíbrio termodinâmico. Como o valor de Φ , relação de fases, não é um dado

técnico disponível no manual da coluna a ser utilizada, a Equação (2.12) fornece os meios para alcançar tal valor (PÉTER, TÖRÖK e FÜLÖP, 1998):

$$\phi = \frac{V_a - V_M}{V_M} \quad (2.12)$$

em que V_a representa o volume de adsorvente e V_M o volume morto da coluna.

Quando há uma mistura de analitos, há outros parâmetros que podem ser obtidos para caracterizar termodinamicamente o sistema. Tais parâmetros são $\Delta(\Delta G)$; $\Delta(\Delta H)$ e $\Delta(\Delta S)$, que representam as diferenças entre ΔG , ΔH e ΔS , respectivamente, para um dado par de analitos (ROSA, 2005; SILVA JUNIOR, 2006; DIAS, 2007).

A interação entre dois componentes pode ser relacionada pela seletividade, que é a razão entre as constantes modificada de Henry para o composto i e j . A Equação (2.13) relaciona a seletividade com a variação da energia livre de Gibbs (FREITAS, 2009):

$$\alpha = \frac{K_{pi}}{K_{pj}} = \exp \left[\frac{\Delta(\Delta G)}{RT} \right] \quad (2.13)$$

Combinando a Equação (2.13) com a relação de Gibbs-Helmholtz (Equação 2.9), chega-se a Equação (2.14), que por meio do gráfico de van't Hoff, $\ln(\alpha)$ versus $1/T$, fornecerá os valores de $\Delta(\Delta H)$ e $\Delta(\Delta S)$ (CABUSAS, 1998; HE *et al.*, 2004).

$$\ln \alpha = -\frac{\Delta(\Delta H)}{RT} + \frac{\Delta(\Delta S)}{R} \quad (2.14)$$

Em baixas temperaturas, a separação é controlada pelo termo entálpico, $\Delta(\Delta H)$. Esse caso é o mais comum na cromatografia líquida, e representa o decréscimo da seletividade com o aumento da temperatura (SILVA JUNIOR, 2006).

A seletividade termodinâmica dos compostos, como já mencionado, expressa pela Equação (2.13) tem a entalpia como principal influência em baixas temperaturas, ao passo que com o aumento da temperatura o termo entálpico será compensado pelo entrópico. Em uma dada temperatura o termo entrópico compensará totalmente o termo entálpico, levando a uma completa não separação dos compostos, ou seja $\Delta(\Delta G)$ igual a 0 e α igual a 1. Aplicando α igual a 1 na Equação (2.14) chega-se a Equação (2.15), que define a temperatura limite de separação. Este fenômeno é conhecido como temperatura isosseletiva, T_{iso} . Nesta temperatura não há separação entre os componentes e temperaturas superiores a T_{iso} podem levar a uma inversão na ordem de

eluição dos adsorbatos na coluna (SCHLAUCH e FRAHM, 2001; HE *et al.*, 2004; WENG *et al.*, 2004; ROJKOVIČOVÁ *et al.*, 2004; SILVA JUNIOR, 2006).

$$T_{iso} = \frac{\Delta(\Delta H)}{\Delta(\Delta S)} \quad (2.15)$$

Isotermas de adsorção

A isoterma de adsorção é uma ferramenta fundamental para a investigação dos processos físicos envolvidos na retenção cromatográfica. O significado da isoterma de adsorção, neste contexto, é que descreve quantitativamente a distribuição de equilíbrio entre as duas fases envolvidas nos processos cromatográficos. Assim, um exame amplo das isotermas de adsorção rende informações sobre o solvente, o soluto e o adsorbato como também as interações entre estas espécies que acontece durante a adsorção (JACOBSON *et al.*, 1984).

As isotermas, geralmente não apresentam um caráter linear. As configurações das isotermas estão intimamente ligadas as concentrações de trabalho (JACOBSON *et al.*, 1984).

Giles e colaboradores (1960) realizaram uma série de experimentos para adsorção de solutos orgânicos em uma série de fases estacionária, e assim obter suas respectivas isotermas. De acordo com Giles *et al.* (1960) o comportamento inicial da isoterma tem uma característica linear devido a viabilidade de sítios de adsorção disponíveis na fase estacionária. À medida que os sítios tornam-se mais escassos ocorre a competição entre o adsorbato por sítios ativos ainda disponíveis, levando ao desvio da linearidade da isoterma (GILES *et al.*, 1960).

A modificação da isoterma não se dá apenas pela injeção de um composto em uma fase móvel pura, mas também a injeção de um composto puro em uma fase móvel binária, isso ocorre devido à competição para atingir o equilíbrio de um componente na coluna, este fenômeno é possível apenas se a energia de adsorção de um componente é maior do que a do outro (JANDERA *et al.*, 2001).

Em cromatografia analítica, o intuito é a identificação, estudo da separação e obtenção de parâmetros cromatográficos como: resolução, seletividade e tempo de retenção. Colunas analíticas não suportam grandes concentrações de analitos, pois pode ocorrer uma sobrecarga de massa e, com isso, a completa saturação dos sítios ativos, o que pode acarretar na perda da coluna. Devido a essa restrição física, usa-se baixas concentrações para a obtenção das isotermas e parâmetros cromatográficos. A cromatografia preparativa é destinada ao isolamento de um composto, purificação, tendo como meta sempre a produção. Nesta modalidade de cromatografia, devido a maior quantidade de adsorvente na coluna, pode-se utilizar maiores concentrações nos estudos (MEYER, 2004).

A inclinação de uma isoterma corresponde ao coeficiente de distribuição, K , discriminando duas partes da isoterma: a linear e a não linear. Na região linear, K é igual a constante modificada de Henry, K_p . Para a região não linear K se torna menor e alcança um valor limite em altas concentrações de soluto (MEYER, 2004; SCHIMDT-TRAUB, 2005). Quanto maior o K_p de uma substância maior será sua interação com o adsorvente, resultando assim em um maior tempo de retenção do composto na coluna (ROUQUEROL *et al.*, 1999).

A constante de Henry provê uma medida direta das interações entre uma molécula adsorvida e os sítios mais favoráveis para a adsorção na superfície do adsorvente

As funções termodinâmicas padrão K_p , ΔG , ΔH e ΔS em diluição infinita podem ser determinadas a partir da inclinação da tangente inicial da isoterma. Estes parâmetros podem ainda ser derivados do fator de retenção (k_i) (SEIDEL-MORGENSTERN e GUIOCHON, 1993).

A Figura (2.3) representa algumas isotermas competitivas descritas por Brunauer e colaboradores (1940).

Curvas côncavas (Tipo I) têm sido historicamente designadas como ‘favoráveis’ à adsorção. A curva do Tipo I é um caso em que o soluto tem alta afinidade com a fase estacionária, que em soluções diluídas o analito é completamente adsorvido. A região inicial da curva do Tipo I apresenta linearidade (GILES *et al.*, 1960; LEVAN, CARTA e YON, 1997).

As isotermas do Tipo II e Tipo IV mostram que, inicialmente, quanto mais sítios ativos são preenchidos torna-se mais difícil a molécula da amostra ser adsorvida. A inflexão mostra que pode não haver uma competição forte entre o analito permanecer na fase estacionária e na fase fluida (GILES *et al.*, 1974).

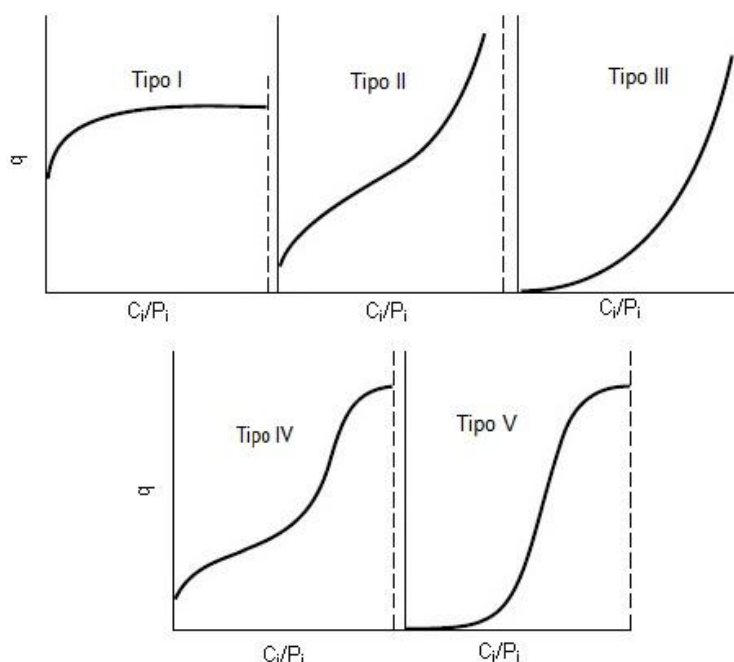


Figura 2.3 – Modelos de isotermas de adsorção (adaptada de BRUNAUER *et al.*, 1940).

As isotermas convexas (Tipo III) são consideradas isotermas 'desfavoráveis' a dessorção. A direção inicial das curvas do Tipo III e Tipo V mostram que a adsorção é facilitada com o aumento da concentração na fase móvel. Na prática as curvas do Tipo III e Tipo V só acontecem quando três condições são cumpridas: (a) a molécula do soluto deve ser monofuncional; (b) a atração intermolecular deve ser moderada, a fim de causar uma camada adsorvida regular sobre o adsorvente e (c) quando a molécula encontrar uma forte competição pelos sítios de adsorção (GILES *et al.*, 1960; LEVAN, CARTA e YON, 1997).

É sabido que a termodinâmica controla o perfil das bandas cromatográficas, particularmente quando se trabalha em altas concentrações e quando a cinética de transferência de massa é baixa. O conhecimento da isoterma ainda pode ajudar a prever a extensão da recuperação de um dado composto e a taxa de produção. De acordo com isso, vários modelos foram produzidos ao longo do tempo. A seguir, segue-se alguns dos modelos de isotermas encontrados na literatura (RUTHVEN, 1984; GRITTI *et al.*, 2003).

Modelo linear

Uma exigência termodinâmica é que ocorra uma aproximação linear para todos os modelos de isotermas. O modelo linear ocorre em baixas concentrações de soluto na fase móvel (LEVAN, CARTA e YON, 1997). Conforme a Equação (2.16).

$$q = K_p c \quad (2.16)$$

em que K_p representa a constante modificada de Henry, c a concentração de soluto na fase móvel e q a concentração em equilíbrio na fase estacionária.

A isoterma linear é caracterizada pela constante de partição constante entre o soluto presente na amostra e na fase estacionária, isso ocorrerá até um ponto limite de saturação (GILES *et al.*, 1960). Giles e colaboradores (1974) descreveram que quando ocorre a isoterma linear o número de sítios ativos permanece constante, mas não necessariamente com o mesmo nível de energia, em toda a faixa de concentração estudada.

Alguns outros modelos de isotermas são apresentados na Tabela (2.1).

Tabela 2.1 – Modelos de isotermas

Isoterma	Modelo	Observação
Langmuir	$q = \frac{ac}{1 + bc}$	Considera que a adsorção ocorre em uma superfície composta com um número fixo de sítios de adsorção de igual energia, ocorrendo à adsorção de uma molécula por sítio ativo (LANGMUIR, 1916; JAMES <i>et al.</i> , 1999; GRITTI <i>et al.</i> , 2003)
Freundlich	$q = K_F c^b$	Corresponde a uma distribuição exponencial das energias de adsorção. É mais indicada para correlacionar dados de adsorventes heterogêneos e altas faixas de concentração (FREUNDLICH, 1916; LEVAN, CARTA e YON, 1997).
Tóth	$q = \frac{ac}{[1 + (bc)^\nu]^{\frac{1}{\nu}}}$	O modelo considera uma superfície heterogênea. O grau desta heterogeneidade é descrita pelo parâmetro, ν , com $0 \leq \nu \leq 1$, $\nu = 1$ indicando uma superfície completamente homogênea (TÓTH, 1971; CAVAZZANI <i>et al.</i> , 2002; SILVA JUNIOR, 2003)

Langmuir modificado	$q = h_i c_i + q_s \frac{b_i c_i}{1 + b_i c_i + b_2 c_2}$	Faz aproximação à região linear, por meio do termo h_i, que representa a constante de equilíbrio linear; q_s é a capacidade de saturação monocamada do
	$i = 1,2$	adsorvente e b_i refere-se a constante de equilíbrio de adsorção (RODRIGUES <i>et al.</i>, 1995; MAZZOTI <i>et al.</i>, 1997; ZHANG <i>et al.</i>, 2003)

2.4 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

A cromatografia ocupa um lugar de destaque nos métodos de análise devido à facilidade com que efetua separação, identificação e quantificação das espécies químicas (COLLINS, 2006).

O princípio da separação cromatográfica se dá por um método físico-químico dos componentes da mistura, realizada por meio da distribuição desses componentes em duas fases, que estão em contato íntimo. Um das fases das fases permanece estacionária (adsorvente), enquanto a outra se move através dela (fase móvel). A cromatografia foi inicialmente desenvolvida para a extração e purificação de misturas complexas de origem vegetal (MEYER, 2004; DITZ, 2005; COLLINS, 2006; GUIOCHON, 2012).

Existem várias formas de realizar o processo cromatográfico e várias classificações de processos cromatográficos, assim como há diversos critérios para realizar tal classificação. Os critérios mais comuns são os relacionados com a técnica empregada, ao mecanismo de separação envolvido e os diferentes tipos de fases utilizadas. Levando tais critérios como base pode-se citar a cromatografia planar, cromatografia gasosa, cromatografia líquida e a cromatografia supercrítica (COLLINS, 2006).

Dentre os métodos cromatográficos de separação, a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), que é uma técnica inserida na cromatografia líquida, é uma das técnicas mais importantes, na qual 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 SILVA JUNIOR, 2003; ROSA, 2005).

O avanço real da cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) começou durante a década de 1960, quando partículas porosas de pequenos diâmetros tornaram-se mais acessíveis

ao mercado. Em meados de 1970 a técnica CLAE passou a ser uma técnica de rotina, devido a viabilidade das colunas empacotadas com sílica gel de fase reversa (DITZ, 2005).

Uma exigência em CLAE é a que a amostra seja solúvel na fase móvel utilizada. Caso esse requisito não seja atendido, pode ocorrer de o soluto não ser transportado através da coluna pela fase móvel (SILVA JUNIOR, 2003).

A CLAE, como atualmente conhecida, tem muitos usos tais como: métodos de separação, análise química de misturas, análises quantitativas e qualitativas de amostras. Se comparado a outros métodos a CLAE é excepcional em termos de (SNYDER *et al.*, 1979):

- aplicação quase universal, poucas amostras são excluídas da possibilidade de separação em CLAE;
- notável precisão em ensaios ($\pm 0,5\%$ ou acima, em muitos casos);
- uma vasta gama de equipamentos, colunas e outros materiais disponíveis no mercado, permitindo o uso da CLAE para quase todas as aplicações.

Além disso, a CLAE transformou o controle de qualidade nas indústrias químicas e farmacêuticas, devido ao seu rápido meio para avaliar a pureza de substâncias e, ainda permite a purificação de pequenas quantidades de amostras. A maioria dos sistemas utiliza detectores de absorção ultravioleta e espectrometria de massas para detectar as substâncias que são eluídas através da coluna. A técnica da cromatografia pode utilizar diversos tipos de adsorventes como fase estacionária. Dessa maneira, a separação cromatográfica pode ser estudada de maneira a aperfeiçoar a separação e reduzir o custo do processo (JARDIM, COLLINS e GUIMARÃES, 2006).

Um esquema de um equipamento CLAE padrão é apresentado na Figura (2.4). Há equipamentos compostos com diferentes arranjos, com o intuito de suprir as necessidades do usuário.

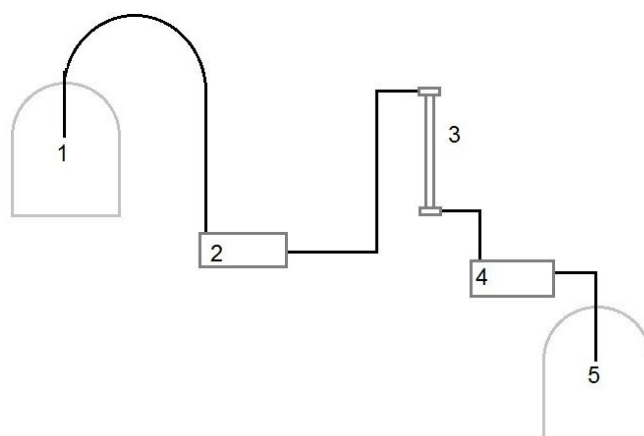


Figura 2.4 – Representação esquemática de um equipamento CLAE padrão: 1 – Reservatório de fase móvel; 2 – Bomba; 3 – Coluna cromatográfica; 4 – Detector; 5 – Resíduo (Adaptada de JARDIM, COLLINS e GUIMARÃES, 2006).

2.5 Cromatografia líquida de fase reversa

Cromatografia de fase reversa (*RPLC* – da sigla em inglês *Reversed-phase liquid chromatography*) é o termo usado para descrever o estado quando a fase estacionária é menos polar do que a fase móvel (MEYER, 2004). Entre os diferentes meios de separação em CLAE, por exemplo, cromatografia líquida por exclusão, cromatografia líquida por troca iônica, definitivamente a cromatografia líquida de fase reversa tem tido posição dominante no mercado. Estima-se que a *RPLC* represente entre 80-90% das separações em cromatografia líquida. A diversidade de colunas de fases reversas de alta qualidade associada à vasta gama de ferramentas para controle e otimização da separação renderam à fase reversa esse posto no mercado mundial (CLAESSENS e van STRATEN, 2004; URBAN *et al.*, 2007).

Se comparada com outras formas de CLAE (fase normal, cromatografia de troca iônica, etc.), separações por cromatografia líquida de fase reversa são usualmente mais convenientes, robustas e versáteis, podendo utilizar diversas fases móveis, o que não é possível em outras técnicas cromatográficas. Colunas de fase reversa ainda tendem a ter maior eficiência e repetibilidade e, estão dispostas no mercado em uma ampla faixa de tipos de adsorventes e tamanhos de partículas (SNYDER, KIRKLAND e DOLAN, 2010).

A fase reversa tem uma vasta aplicação, dependendo da base utilizada como fase estacionária, porém muitos compostos orgânicos tem uma solubilidade limitada em água (fase móvel mais comum em cromatografia de fase reversa) ou em solventes orgânicos/água, o que limita um pouco a aplicação. Nestes casos, onde a solubilidade da amostra é baixa em água ou misturas solventes orgânicos e água (amostras muito hidrofóbicas), o uso de cromatografia de fase normal, utilizando-se da fase móvel não aquosa é mais aconselhável (SNYDER, KIRKLAND e DOLAN, 2010).

2.5.1 Fase estacionária baseada em sílica

As fases estacionárias apolares são com maior frequência, partículas esféricas de sílica recobertas com cadeias de carbono. Uma das fases estacionárias mais utilizadas em *RPLC* é a C_{18} , que é composta por partículas de sílica recobertas com uma cadeia de 18 carbonos (LANÇAS, 2009).

Em aplicações práticas, a sílica ainda domina como base sólida para fase estacionária em CLAE. As vantagens desejadas na sílica são: alta resistência mecânica, e habilidade para seguramente ser manufaturada em partículas de diâmetro específico de adsorvente, diâmetro de poro e área superficial. Separações em cromatografia líquida de fase reversa tiveram uma melhora significativa quando sílicas modificadas com recobrimentos hidrofílicos usando organossilanos passaram a ser utilizadas (PESEK e MATYSKA, 2005).

Todas as fases estacionárias, que tem a sílica por base, possuem grupos funcionais de ácido silanol polar (Si-OH) em sua superfície. Com o intuito de diminuir o número de silanóis,

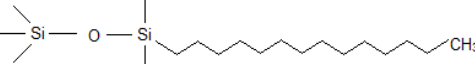
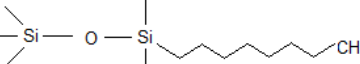
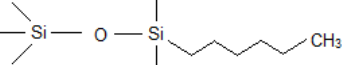
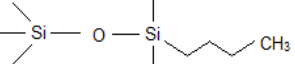
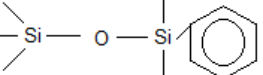
pequenos recobrimentos orgânicos, como o metil (C1), são usados para desativar sítios de silanos, após iniciado o processo de preparo da sílica (PESEK e MATYSKA, 2005).

Devido aos grupos silanóis remanescentes na superfície da sílica, mesmo após seu recobrimento, as fases estacionária baseadas em sílica, possuem ambos mecanismos de separação: fase reversa e fase normal. Isso se dá devido a interação dos compostos com os grupos silanos, remanescentes na superfície da sílica (NAWROCKI, 1997). O recobrimento da sílica situa-se em 80%, nos melhores casos, mas é comum encontrar no mercado sílicas com 50% de recobrimento. Com o intuito de diminuir o problema com silanos na superfície da sílica, usualmente o átomo de hidrogênio do grupo é substituído por um grupo trimetilsilil (SCHÜLTER, 1999).

Dependendo da modificação na superfície da sílica, os adsorventes de fase reversa podem ser agrupados em (a) sílicas de fase reversa monomérica, quimicamente modificadas com grupos silanos monofuncionais ou (b) fase reversa polimérica, feita com uma camada de polímero, por reação na superfície da sílica, com grupos trissilanos (MEYER, 2004).

Atualmente há no mercado diversos tipos de recobrimentos para a sílica, com isso torna-se possível a separação e quantificação de diversos compostos, como: pequenas proteínas (<50-100 kDa), peptídeos, oligonucleotídeos, amino ácidos e fármacos (SCHLÜTER, 1999). De acordo com Schülter (1999), outros compostos podem ser separados em colunas baseadas em sílica, basta adequar a fase móvel e as condições do sistema, para que a separação possa ser observada. A Tabela (2.2) apresenta algumas fases estacionárias baseadas em sílica. O termo ‘fase reversa’ também é aplicado para sílicas recobertas com polímeros hidrofóbicos (LANÇAS, 2009).

Tabela 2.2 – Principais fases estacionárias empregadas na cromatografia líquida de partição operando no modo reverso (RP) (LANÇAS, 2009).

Grupo funcional	Fase estacionária	Denominação
Octadecil		Octadecilsilano, C ₁₈ , ODS, RP ₁₈
Octil		Octilsilano, C ₈ , RP ₈
Hexil		Hexilsilano, C ₆ , RP ₆
Butil		Butilsilano, C ₄ , RP ₄
Fenil		Fenilsilano

2.6 Técnicas em cromatografia

2.6.1 Métodos de obtenção de isothermas de adsorção

De acordo com Jacobson (1984), Glueckauf foi o primeiro a usar cromatografia gasosa para medir isothermas em 1947, Jacobson (1984) mencionou que Conder e Young (1979) apresentaram uma revisão dos métodos de obtenção de isothermas por cromatografia gasosa. Tais métodos podem ser aplicados para a cromatografia líquida. O método em cromatografia líquida mais simples é a Análise Frontal. Introduzida por James e Phillips, (1954); e Schay e Székely, (1954), esse método relaciona a velocidade da concentração frontal formada por um incremento na concentração do soluto (JACOBSON, 1984).

As isothermas podem ser obtidas por métodos estáticos (ou batelada) e dinâmicos. Os métodos estáticos de medição de isothermas de adsorção não analisam o tempo nas curvas de concentração, mas usam apenas as informações do estado de equilíbrio (SEIDEL-MORGENSTERN, 2004). Os métodos estáticos se caracterizam por analisar a solução já em seu estado de equilíbrio, ou seja, tais métodos envolvem volumes ou massas conhecidos do material adsorvente que é equilibrado com volumes conhecidos de solução em uma dada concentração de soluto. Após o término do fenômeno da adsorção, o equilíbrio entre a fase estacionária e a solução é medido e a quantidade de material adsorvido por unidade de volume ou massa de adsorvente é obtida (MARCHETTI *et al.*, 2009). Como exemplos de métodos estáticos tem-se: método batelada, método da adsorção-dessorção, método da circulação.

Os métodos dinâmicos são baseados na análise matemática da curva de resposta de diferentes concentrações definidas na entrada da coluna. O princípio básico do método é injetar grandes quantidades de amostras em uma coluna, previamente equilibrada com a fase móvel, e analisar a resposta obtida. Baseado no tipo de 'perturbação' gerada na coluna o método é dividido em três grandes grupos: a injeção de grandes amostras, com concentrações diferentes, resultando assim nas chamadas curvas de ruptura; injeções de pequenas amostras em diferentes concentrações e o último grupo é a injeção de pequenos volumes a altas concentrações (MIHLBACHLER *et al.*, 2002; MEYER, 2004; SCHIMDT-TRAUB, 2005).

Como exemplo de métodos dinâmicos, pode-se citar: método da perturbação, método da eluição por pontos característicos e a análise frontal (MIHLBACHLER *et al.*, 2002).

Análise Frontal

O método mais praticado e conhecido para se obter isothermas de adsorção é a Análise Frontal (AF). Ela relaciona o ponto da isoterma a uma dada concentração de soluto na fase móvel com o tempo de saturação da coluna, na concentração estudada. A AF também apresenta alta precisão se comparada a métodos estáticos e relativa simplicidade na aplicação (GUIOCHON *et al.*, 1994; MIHLBACHLER *et al.*, 2002).

A determinação da isoterma de adsorção por Análise Frontal (AF) é o problema inverso se comparado com a predição de curvas de ruptura de isotermas conhecidas. Uma vez que a teoria do equilíbrio fornece uma ferramenta conveniente para prever o formato característico de tais curvas (platô intermediário e tempo de retenção), apenas esses dados devem ser determinados experimentalmente para resolver o problema inverso (LISEC, 2001).

Na determinação de isotermas competitivas por meio da AF, a coluna inicialmente condicionada com a fase móvel, é alimentada por uma solução contendo uma concentração conhecida da mistura em estudo até que a coluna seja completamente saturada. Ao atingir a condição de equilíbrio, outra solução de concentração mais elevada e de valor conhecido é alimentada na coluna até que seja atingido um novo equilíbrio. Esse procedimento é repetido sucessivas vezes gerando sucessivas curvas de ruptura (em forma de degraus sucessivos). Cada curva de ruptura fornecerá um ponto na isoterma de adsorção competitiva (JACOBSON *et al.*, 1987; GUIOCHON *et al.*, 1994). Na Figura (2.5) é representada a adsorção de um dado composto e os parâmetros obtidos por meio da metodologia AF.

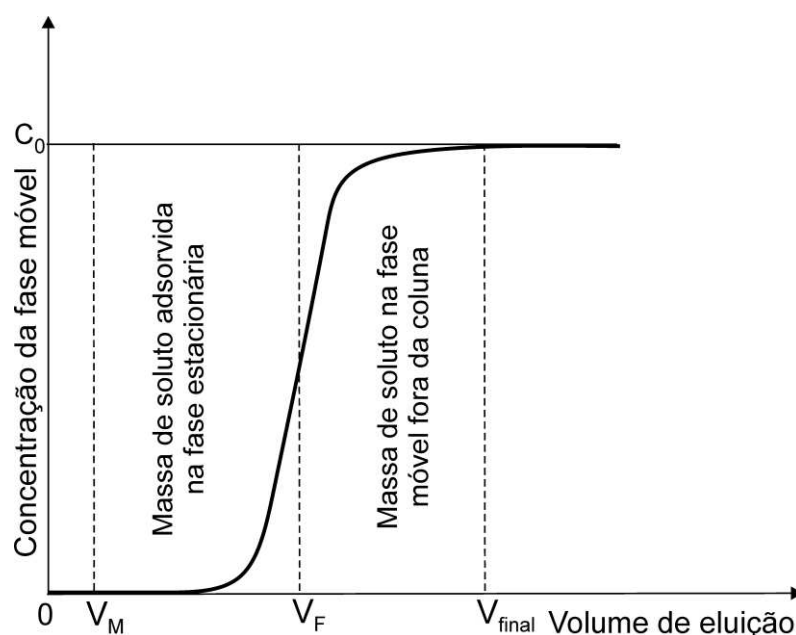


Figura 2.5 – Representação esquemática de uma curva de ruptura (adaptado de GRITTI *et al.*, 2003).

Os dados experimentais da isoterma de adsorção podem ser determinados tanto para a etapa de adsorção da curva de ruptura quanto para a etapa de dessorção, de acordo com os balanços de massa representados pela Equação (2.17) (MARCHETTI *et al.*, 2009).

$$q = \frac{c(V_F - V_M)}{V_a} \quad (2.17)$$

em que V_a é o volume de adsorvente no sistema, descrito na Equação (2.18), c é a concentração de alimentação, V_F é o volume de retenção no ponto de inflexão da curva de ruptura, V_M é o volume morto do sistema.

$$V_a = V(1 - \varepsilon) \quad (2.18)$$

em que V representa o volume da coluna vazia.

Seidel-Morgenstern (2004) relata que o método da análise frontal é um dos mais recomendados para se determinar isotermas de amostras com mais de dois componentes, apesar de seu alto consumo de solvente. O método da adsorção-dessorção também é aplicado satisfatoriamente nestes casos. O método da perturbação torna a construção de isotermas com mais de dois compostos um sistema difícil e inviável.

2.6.2 Pulsos cromatográficos

A técnica da injeção de pulsos cromatográficos não apenas promove a separação de componentes em misturas, mas também é uma técnica útil para a determinação de parâmetros cromatográficos, termodinâmicos e de transferência de massa. Além disso, teorias matemáticas, baseadas na cromatografia de pulso, foram desenvolvidas, tornando-a possível de aplicar para medidas de processos de transporte que acompanham a adsorção em leitos adsorventes (SCHWANKE, 2003).

A cromatografia em pulso é baseada na injeção de um pulso do sorbato, de volume conhecido, tal volume é definido no *loop* da válvula do *CLAE*. O pulso gera uma curva cromatográfica, cromatograma, como resposta. Os cromatogramas são as ferramentas necessária para determinar o tempo de retenção de um composto. Um estudo mais criterioso, como a variação da concentração da injeção e vazão, pode fornecer os parâmetros termodinâmicos e de transferência de massa.

Apesar de a análise *CLAE* ser precisa, a repetibilidade desejada nem sempre é alcançada, devido a diversos fatores, como imprecisão operacional e do equipamento, ocasionando, na maioria dos casos, um alargamento do pico cromatográfico. Suzuki (1990) relata que em um sistema cromatográfico o alargamento do pico de resposta à injeção de um soluto resulta da combinação da dispersão axial e resistências à transferência de massa, tanto nas partículas do sorbato quanto nas partículas do meio poroso. Portanto, torna-se difícil extrair valores seguros dos parâmetros cromatográficos por meio de uma única injeção e avaliando um único pico resposta.

Por esta razão, os experimentos são usualmente conduzidos em diferentes condições experimentais (ou de análises). Em geral, os principais fatores que influenciam nos resultados são a vazão da fase móvel, a temperatura e, em muitos casos, o diâmetro das partículas de adsorvente (SUZUKI, 1990; SCHWANKE, 2003).

2.7 Parâmetros cromatográficos

As informações básicas para o desenvolvimento de uma separação cromatográfica são retiradas de um cromatograma. A Figura (2.6) exemplifica um cromatograma resultante para a injeção de uma amostra contendo três compostos diferentes.

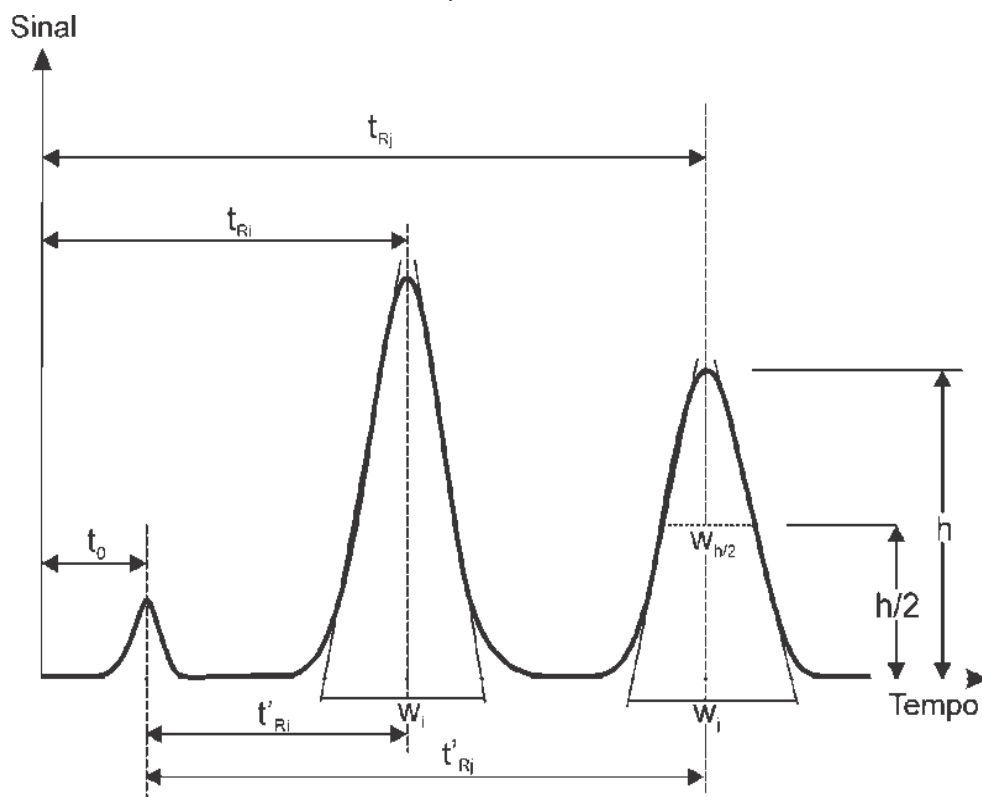


Figura 2.6 – Cromatograma resultante para a injeção de uma amostra contendo três componentes distintos (adaptada de SCHULTE e EPPING, 2005).

A força de interação de cada componente com a fase estacionária é proporcional ao tempo de retenção, t_{Ri} .

O tempo morto total, t_{total} , é a diferença entre o tempo de entrada e saída de um composto inerte na coluna, e isso é afetado pelo volume da cabeça da bomba, diâmetro da tubulação, volume no detector, distância entre a injeção da amostra e a detecção. Em assim sendo, o tempo morto da planta, t_{plant} , deve ser determinado e, isso é feito com a injeção de um composto inerte no sistema sem a coluna. O tempo de retenção, t_{Ri} , de um composto i retido é a soma do tempo morto

da coluna, t_0 é o tempo que o composto ficou realmente retido na coluna (SCHULTE e EPPING, 2005). O tempo morto da coluna pode ser obtido pela Equação (2.19).

$$t_0 = t_{total} - t_{plant} \quad (2.19)$$

Assim, torna-se possível a obtenção do tempo de retenção corrigido, definido por Jardim, Collins e Guimarães *et al.* (2006) como representado na Equação (2.20). Apesar da correção do tempo de retenção, quando o termo tempo de retenção é usado, geralmente ele se refere ao tempo de retenção global.

$$t'_{Ri} = t_{Ri} - t_0 \quad (2.20)$$

Resolução

A resolução cromatográfica, R_s , é uma medida de quão separados estão dois picos adjacentes. Três fatores importantes são responsáveis pela variação na resolução: a seletividade, o fator de retenção e a eficiência da coluna (SCHMIDT-TRAUB, 2005). Collins (2006) relata que, para ocorrer uma separação razoável entre dois compostos, a resolução entre eles deve ser igual ou superior a 1,5.

A resolução pode ser obtida por meio das Equações (2.21) e (2.22).

$$R_s = \frac{\sqrt{N}}{4} \left(\frac{k}{k+1} \right) \left(\frac{\alpha-1}{\alpha} \right) \quad (2.21)$$

$$R_s = 1,177 \frac{(t_{Ri} - t_{Rj})}{w_{hi} + w_{hj}} \quad (2.22)$$

em que a Equação (2.21) relaciona o número de pratos da coluna, N , o fator de retenção, k , e a seletividade, α . Já a Equação (2.22) relaciona o tempo de retenção do composto i e j na coluna, com a largura do pico a meia altura, w_{hi} .

Schmidt-Traub (2005) ainda relata que, em teoria, a equação da resolução apresenta três possibilidades para o incremento em seu valor final: aumentando o valor do fator de retenção, modificando a eficiência da coluna, por meio de modificações na fluidodinâmica da coluna, como por exemplo: melhorar o empacotamento da coluna, reduzir o diâmetro de partículas adsorventes ou otimizar a fase móvel. A terceira opção é manter o sistema o mais próximo do valor desejado de resolução possível e alterar a temperatura do sistema.

As estratégias propostas por Schmidt-Traub (2005) são as mais praticáveis dentro da cromatografia. Urban *et al.* (2007) apontaram que com a redução no diâmetro médio das partículas adsorventes a separação entre proteínas torna-se mais fácil, para o sistema em estudo. Claessens e van Straten (2004) mostraram que para fases reversas e injeções de solventes orgânicos e uracil o aumento da temperatura reduz consideravelmente o tempo das análises, porém reduz também a resolução do sistema.

Fator de retenção

O tempo de retenção de uma substância na coluna depende, além das forças envolvidas entre a fase móvel e fase estacionária, da geometria da coluna e da vazão de fase móvel. Com isso, foi introduzido o fator de retenção, k , que é caracterizado 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) (SCHMIDT-TRAUB, 2005; COLLINS *et al.*, 2006). O fator de retenção pode ser obtido por meio da Equação (2.23).

$$k_i = \frac{n_s}{n_m} = \frac{(t_{Ri} - t_0)}{t_0} \quad (2.23)$$

Seletividade

Dois componentes não podem ser separados caso possuam o mesmo fator de retenção (k_i), pois isso implica que os componentes terão o mesmo tempo de retenção na coluna. Um meio de avaliar a separação e quão separáveis são os componentes é a seletividade (α), relacionada na Equação (2.24) e (2.25) (MEYER, 2004).

$$\alpha = \frac{k_i}{k_j} = \frac{t_{R,i} - t_0}{t_{R,j} - t_0} \quad (2.24)$$

$$\alpha = \frac{K_{pi}}{K_{pj}} \quad (2.25)$$

em que k_i e k_j , na Equação (2.24) representam os valores do fator de retenção de um dado compostos, conforme apresentado na Equação (2.23). A Equação (2.25) traz a seletividade medida

a partir de um ponto termodinâmico, ou seja, por meio das constantes modificadas de Henry, K_{pi} e K_{pj} .

De acordo com Schmidt-Traub (2005) o valor aceitável para a seletividade entre dois compostos é de 1,2. O autor ainda aponta que para separações com seletividade menor que 1,2 o número necessário de pratos cresce drasticamente. E como o aumento no número de pratos está ligado a um aumento na pressão de trabalho do sistema, e ainda, uma diminuição no diâmetro das partículas adsorventes, o custo da separação tem um substancial acréscimo.

Número de pratos

A eficiência de uma coluna pode ser avaliada por meio do número de pratos (N). Um prato representa uma etapa de equilíbrio do soluto na fase móvel e na fase estacionária. Portanto, quanto maior o número de pratos, maior será o número de etapas de equilíbrio, o que uma maior eficiência da coluna e, conseqüentemente uma maior separação (JARDIM, COLLINS e GUIMARÃES, 2006). O número de pratos é definido pela Equação (2.26).

$$N = 5,545 \left(\frac{t_{Ri}}{w_h} \right)^2 \quad (2.26)$$

em que t_{Ri} , com anteriormente explanado, significa o tempo de retenção e, w_h é a largura do pico cromatográfico a meia altura.

2.8 Fase móvel

Um projeto de separação, empregando a cromatografia líquida, somente terá sucesso se for possível acoplar uma fase móvel correta a uma fase estacionária conveniente (CIOLA, 1998).

A importância da fase móvel no processo de separação pode ser comprovada por meio da análise da equação geral de resolução, R_s , Equação (2.25) e (2.26), na qual dois dos três parâmetros cromatográficos envolvidos :número de pratos, N ; o fator de retenção, k ; e o fator de separação, α ; são fortemente influenciados pela fase móvel.

De acordo com Jardim, Collins e Guimarães (2006) as principais características que as fases móveis utilizadas em CLAE devem apresentar são:

- a) ser de alto grau de pureza e de fácil purificação;
- b) dissolver a amostra sem decompor os seus componentes;
- c) não decompor ou dissolver a fase estacionária;

- d) ter baixa viscosidade;
- e) ser compatível com o tipo de detector utilizado;
- f) ter polaridade para permitir uma separação conveniente dos componentes da amostra.

Além dos fatores citados, há outros que devem ser considerados para a escolha da fase móvel, como: segurança na manipulação, o custo de recuperação do solvente e a energia necessária para o reciclo e evaporação para a recuperação do soluto presente no resíduo (LANÇAS, 2009).

Em se tratando de cromatografia de fase reversa, água é o solvente mais fraco. O mecanismo pelo qual um solvente forte reduz o tempo de retenção de um componente em fase reversa é bem diferente do comportamento em fase normal; na fase reversa não há competição. Em fase reversa a adição de solventes mais fortes diminui o tempo de retenção dos analitos (GUIOCHON e TRAPP, 2012).

Para a cromatografia de fase reversa a fase móvel geralmente é composta de uma mistura de água ou uma solução tampão aquosa. A mistura de água a solventes orgânicos geralmente leva a uma elevação da viscosidade, se comparada aos os solventes puros, como exemplo, o etanol e a água, em 20°C apresentam viscosidade de 1,144 e 1,002 mPa s, respectivamente, já uma mistura contendo 40% de etanol em água apresenta uma viscosidade de 2,8 mPa s (MEYER, 2004). O aumento da viscosidade leva a uma elevada pressão de trabalho, o que gera cuidados extras com o equipamento e com a coluna, pois uma brusca queda de pressão na coluna pode gerar deslocamento da fase estacionária empacotada e, com isso, ocasionar a perda da coluna, sendo necessário um novo empacotamento.

Capítulo 3

3 Materiais e Métodos

Neste capítulo são apresentadas as descrições dos materiais utilizados, bem como os fornecedores e graus de pureza e as metodologias aplicadas durante os experimentos. Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Propriedades Reológicas e Coloidais, pertencente ao DEMbio – Departamento de Engenharia de Materiais e Bioprocessos e no Laboratório de Processos em Meios Porosos pertencente ao Departamento de Engenharia de Processos (DEPro), ambos departamentos da FEQ – Faculdade de Engenharia Química da Universidade Estadual de Campinas.

3.1 Materiais

3.1.1 Padrões cromatográficos para os produtos de síntese do piperonal

A aquisição de padrões para o desenvolvimento experimental desta Dissertação baseou-se em um trabalho prévio, conduzido por Braga (2007), o qual, a partir do óleo essencial da pimenta longa, estudou a obtenção do piperonal, segundo a rota química apresentanda na Figura (1.3).

A composição média dos produtos da oxidação do isosafrol glicol a piperonal, encontrada por Braga (2007) está apresentada na Tabela (3.1).

Tabela 3.1 – Composição química média dos produtos da síntese do piperonal Braga (2007).

Composto	Concentração (mg mL ⁻¹)	%
Terpinoleno	3,741x10 ⁻⁶	0,9
Safrol	7,091x10 ⁻⁶	1,7
<i>cis-trans</i> -isosafrol	3,166x10 ⁻⁵	7,6
Piperonal	3,548x10 ⁻⁴	84,9

O componente majoritário, piperonal (98%), e o safrol ($\geq 97\%$) foram obtidos junto à Sigma-Aldrich. O isosafrol (99,5%) foi obtido junto à ChemService, o componente é vendido em forma racêmica dos isômeros *cis-trans*-isosafrol. O terpinoleno ($\geq 85\%$) foi obtido junto à Fluka.

3.1.2 Fase móvel

A principal fase móvel utilizada, ou seja, aquela que foi utilizada para a obtenção das constantes modificadas de Henry, era composta de uma mistura binária, na proporção de 70/30 (v/v) de etanol e água. O etanol, grau HPLC, foi obtido junto à J. T. Baker, USA. A água utilizada em todos os experimentos foi água deionizada (18,2 M Ω), processada em um equipamento equipado com dois filtros UV e uma membrana de osmose reversa; da marca Elga Laboratory e modelo Purelab Option-Q.

Como já mencionado, uma das exigências das fases móveis é que elas sejam totalmente capazes de solubilizar os solutos. O etanol não é capaz de solubilizar o poliestireno e o uracil, com isso, foi necessário usar fases móveis distintas para cada um dos compostos inertes (poliestireno e uracil).

Para a determinação da fração de vazios do leito (ϵ), o composto inerte utilizado foi o poliestireno, e a fase móvel o tetraidrofurano – THF (99,8%), obtido junto à Tedia, USA.

A porosidade total da coluna (ϵ_t) foi estimada utilizando-se, como fase móvel, uma mistura binária de acetonitrila (99,99%) fornecida pela J. T. Baker (USA) e água, na proporção de 60/40 (v/v).

3.1.3 Componentes inertes

Para a caracterização da coluna, determinação das porosidades da partícula, total e fração de vazios do leito, se faz necessário a escolha de componentes inertes. Esses componentes não podem apresentar interação com a fase estacionária em estudo, neste caso a sílica C₁₈.

Um componente inerte citado na literatura (Miyabe e Guiochon, 2000; Urban, 2007) para a determinação da porosidade total é o uracil (Figura 3.1a). O uracil, gentilmente cedido pelo Instituto de Química da UNICAMP, foi originalmente obtido junto à Sigma-Aldrich (USA) e possuía 98% de grau de pureza e massa molar de 112,09 g mol⁻¹.

O composto inerte utilizado para a determinação da fração de vazio do leito foi o poliestireno (Figura 3.1b), de massa molar 504.500 g mol⁻¹, obtido junto à Polymer Laboratories, Reino Unido.

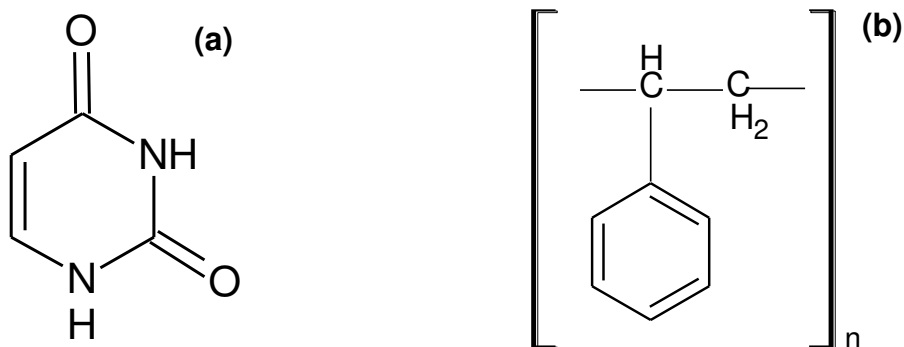


Figura 3.1 – (a) Estrutura química do uracil; (b) Estrutura química do poliestireno.

3.1.4 A fase estacionária

A fase estacionária utilizada para a avaliação da separação do piperonal do safrol isosafrol e terpinoleno, presentes na amostra, foi a sílica C₁₈ Hyperbond. O diâmetro médio das partículas de sílica, de acordo com o fabricante, igual a 10µm e o diâmetro médio dos poros 120 Å. A fase estacionária encontrava-se empacotada em uma coluna de dimensões 300 mm x 3,9 mm. O conjunto, coluna e fase estacionária, foi obtido da TermoQuest.

3.1.5 Equipamentos

Todos os experimentos foram conduzidos em um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência, constituído por: uma controladora modelo CBM-20A/UFLC, um detector UV-Vis modelo SPD-20A, bomba para a solução e bomba para o eluente, LC-10AD e LC-20AT, respectivamente, todos os equipamentos descritos são da marca Shimadzu Corporation, Japão. Os dados gerados pelos equipamentos foram analisados pelo *software* LC Solutions®.

Para a pesagem dos analitos uma balança analítica Mettler (Suíça) modelo AJ150 foi utilizada. As fases móveis foram desgaseificadas em banho ultra-sônico da marca Cole Parmer® modelo 8892R-MT (USA). A temperatura da coluna foi controlada com o auxílio de um banho termostatzado da Marca Solab, modelo SL 152 (Brasil), com precisão de 0,5 °C.

A Figura (3.2) ilustra o conjunto experimental utilizado para o estudo da separação cromatográfica e a determinação das isotermas, em que: 1 – placa controladora; 2 – Detector Uv-Vis; 3 e 4 –Bombas.

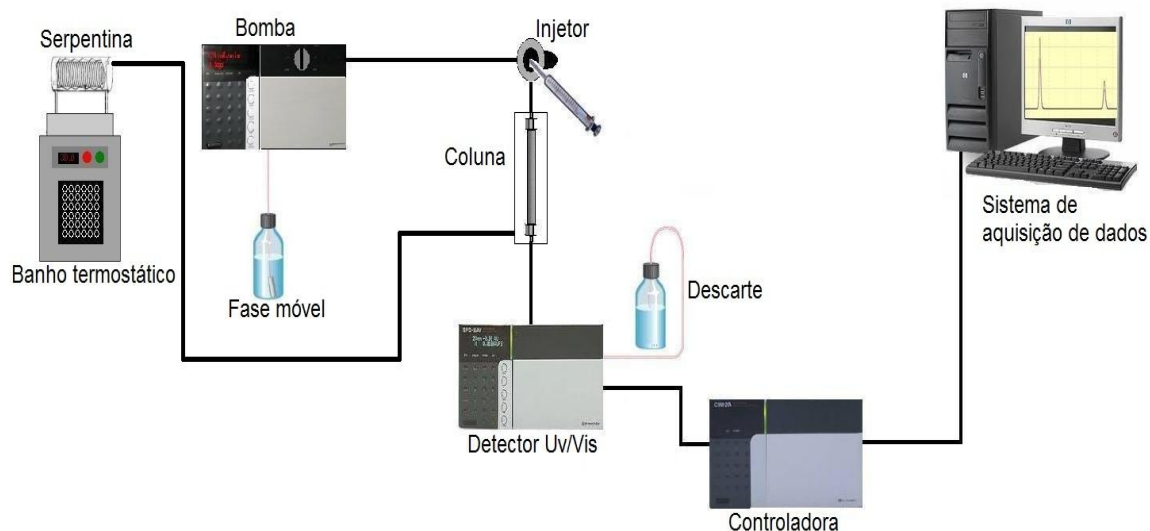


Figura 3.2 – Representação esquemática de um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (adaptada de NASCIMENTO, 2012).

3.2 Métodos

3.2.1 Determinação da fração de vazios do leito

Para a obtenção da fração de vazios do leito, ε , foi utilizada como molécula inerte o poliestireno. Devido a sua elevada massa molar, o que o faz percolar apenas entre as moléculas de sílica, não penetrando em seus poros, e sua não interação com o adsorvente, o poliestireno pode ser utilizado como traçador para a determinação da fração de vazios do leito.

A técnica utilizada para determinar a fração de vazios foi o método dos momentos, que relaciona o tempo de retenção de um dado composto na coluna, com a vazão utilizada. Esse método além de ser útil para obter, de maneira experimental, a fração de vazios do leito e a porosidade total, ainda pode ser aplicado para a determinação do coeficiente de difusão efetivo e de dispersão axial. O método é de simples aplicação e utiliza a técnica de injeção de pulsos cromatográficos (injeção de uma dada quantidade de solução) (MIYABE e SUZUKI, 1992; CREMASCO *et al.*, 2001; SCHWANKE, 2003)

O primeiro momento, técnica utilizada nesta Dissertação, é definido pela Equação (3.1) (MIYABE e SUZUKI, 1992; CREMASCO *et al.*, 2001; SCHWANKE, 2003).

$$\mu = \frac{L}{u_0} \left[1 + \left(\frac{1 - \varepsilon}{\varepsilon} \right) K \right] + \frac{t_0}{2} \quad (3.1)$$

em que μ corresponde ao tempo de retenção do composto na coluna. Os termos L e u_0 correspondem ao comprimento útil da coluna e a velocidade superficial, respectivamente. O tempo morto do sistema é expresso pelo termo, t_0 . K é definido como um termo de equilíbrio termodinâmico e está exposto na Equação (3.2).

$$K = \varepsilon_p + (1 - \varepsilon_p) K_p \quad (3.2)$$

Com o intuito de construir um gráfico de L/t_R versus u_0 e assim, encontrar o valor da fração de vazios do leito; foram injetadas no sistema amostras de 20 μL de poliestireno em THF, em uma concentração de 0,5 g L^{-1} . A vazão de fase móvel (THF) foi ajustada em valores distintos: 0,4; 0,6; 0,8; 1,0 e 1,2 mL min^{-1} . O detector Uv-Vis foi ajustado para 220 nm.

Os tempos de retenção do poliestireno foram avaliados a uma temperatura de 25°C. Foram feitas 3 injeções para cada vazão, e o tempo utilizado para a determinação da fração de vazios do leito corresponde a média das três injeções. Com os tempos de retenção foi possível a construção do gráfico de L/t_R versus u_0 e por meio do coeficiente angular do gráfico é possível determinar a fração de vazios do leito.

3.2.2 Determinação da porosidade da partícula

Para se determinar a porosidade da partícula, ε_p , antes é necessário a determinação da porosidade total. A molécula utilizada nas injeções cromatográficas foi o uracil. Devido a sua, relativa, pequena massa molar, esta percola o leito e ainda penetra os poros do adsorvente, podendo assim fornecer o valor da porosidade total.

O procedimento realizado para o uracil foi semelhante ao realizado para o poliestireno, injeções de 20 μL em vazões variando entre 0,4 a 1,2 mL min^{-1} com passo de 0,2 mL min^{-1} .

A fase móvel adequada para a utilização do uracil, basea-se em uma mistura binária de acetonitrila e água 60/40 (v/v), Miyabe e Guiochon (2000) e Urban *et al.* (2007) reportaram o uso desta fase móvel e do o uracil para a determinação da porosidade total do leito empacotado com sílica C_{18} .

O detector foi ajustado em 254 nm. Assim, como para a determinação da fração de vazios do leito, um gráfico de L/t_R versus u_0 foi construído e, por meio do coeficiente angular, a porosidade total pode ser diretamente obtida.

De posse da fração de vazios do leito (ε) e da porosidade total (ε_T) é possível obter a porosidade da partícula (ε_p), por meio da Equação (3.3).

$$\varepsilon_T = \varepsilon + (1 - \varepsilon)\varepsilon_p \quad (3.3)$$

3.2.3 Curva de calibração

Por meio da curva de calibração é possível obter a concentração de uma dada amostra coletada durante as corridas cromatográficas.

A curva de calibração de cada composto é obtida, por meio da injeção do padrão do componente. A faixa de concentração das amostras injetadas deve-se seguir as concentrações de trabalho, não é recomendado extrapolar os limites da curva.

Para obter as curvas foram feitas injeções de piperonal, safrol, isosafrol e terpinoleno em diferentes concentrações, 0,02; 0,05; 0,1; 0,15 e 0,2 g L⁻¹. Para cada concentração, três soluções das concentrações citadas foram preparadas e de cada solução, foram feitas três injeções. A média da área dos picos das injeções de cada solução foi utilizada para traçar a curva, que é definida como a concentração da injeção *versus* a área dos picos de resposta do pulso.

As curvas de calibração estão expostas no Apêndice B desta Dissertação.

3.2.4 A análise frontal

As isotermas de adsorção dos compostos em estudo, piperonal, safrol, isosafrol, terpinoleno, e da mistura dos produtos resultantes da síntese do piperonal, foram determinadas pelo método da Análise Frontal. Esse método é baseado na análise matemática da curva de ruptura.

Para aplicar esse método, foram utilizadas duas bombas. Com o auxílio de uma das bombas a solução, contendo o composto em estudo, foi injetada continuamente na coluna. A solução foi injetada até que se alcançasse a completa saturação da coluna, ou seja, que a formação de um platô de concentração possa ser observado. Após o equilíbrio alcançado, uma segunda bomba injetou apenas a fase móvel com o intuito de regenerar a coluna.

Cada concentração utilizada na curva de ruptura representa um ponto na isoterma de adsorção, para a construção das isotermas foram fixados cinco pontos, sendo que as concentrações utilizadas foram as mesmas utilizadas para a obtenção da curva de calibração, 0,02; 0,05; 0,1; 0,15 e 0,2 g L⁻¹.

Depois de obtidas as curvas de ruptura, os dados foram analisados matematicamente, por meio da derivada primeira, e assim, os valores de volume de inflexão (V_F) para cada componente foram obtidos, e posteriormente utilizados na Equação (2.17).

$$q = \frac{c(V_F - V_M)}{V_a} \quad (2.17)$$

em que V_F refere-se ao volume da inflexão, V_M o volume morto do sistema e V_a é o volume de adsorvente na coluna.

Para a determinação das curvas de ruptura para os compostos em estudo, o detector UV-Vis foi ajustado para 230 nm para todos os componentes estudados, com exceção ao piperonal, que teve sua detecção ajustada para 245 nm.

3.2.5 Otimização da fase móvel

A fase móvel inicialmente utilizada, 100 % etanol, provou não ser eficiente para a separação dos compostos estudados, em assim sendo, foi necessário uma nova estratégia para a separação e, o passo tomado foi a adição de água ao etanol. A literatura (MEYER, 2004; MIYABE e GUIOCHON, 2004; WEWERS *et al.*, 2005; JANDERA, KUČEROVÁ e URBAN, 2011) reporta o uso de água em fases móveis para cromatografia líquida de fase reversa.

Foram feitas soluções, etanol/água, com proporções variadas de água em sua composição. Com o intuito de avaliar as novas fases móveis uma solução da mistura dos produtos resultantes da síntese do piperonal foi preparada, na concentração de $0,5 \text{ g L}^{-1}$, para cada fase móvel diferente foram feitas 3 injeções de $20 \mu\text{L}$. Para o estudo da fase móvel a temperatura foi mantida constante em 25°C .

O cromatograma resultante das injeções era então avaliado, com o objetivo de verificar as modificações causadas com a adição da água ao sistema. As proporções de água utilizadas foram: 10, 15, 20 e 30% de água, sempre na razão volume/volume.

Após a avaliação dos cromatogramas, elegeu-se a fase móvel composta de 70/30 (v/v) etanol/água, como sendo a fase móvel que melhor se aplicaria ao estudo termodinâmico e da viabilidade da separação dos piperonal dos demais componentes oriundos da síntese orgânica.

Capítulo 4

4 Resultados e discussões

4.1 Determinação da fração de vazios do leito e porosidade da partícula

4.1.1 Determinação da fração de vazios do leito

Antes de determinar qualquer porosidade, deve-se determinar o tempo morto do sistema, t_0 , isso é feito por meio da injeção de uma molécula inerte, no sistema sem a coluna. Esse procedimento mostra o tempo que uma molécula leva para sair do injetor e percorrer toda a tubulação presente.

A determinação do tempo morto deve ser realizada nas mesmas vazões que o trabalho irá ser conduzido. Dessa maneira, é possível determinar o tempo de retenção corrigido (t'_R) de cada composto.

A Tabela (4.1) apresenta os valores dos tempos de retenção para a injeção de poliestireno e uracil, no sistema sem a coluna, e para o sistema montado com a coluna. Na Tabela (4.1), t_0 representa o tempo que o uracil levou para percorrer o caminho do injetor ao sistema de detecção UV-Vis. O $t_{poliestireno}$, representa o tempo de retenção do poliestireno no sistema, este montado com a coluna, e a variável t_{uracil} , é definida como o tempo de retenção do uracil no sistema, também com a presença da coluna.

Tabela 4.1 – Tempo morto para o sistema cromatográfico determinado com a injeção de poliestireno e uracil (0,5 g L⁻¹) no sistema CLAE.

$Q(mL\ min^{-1})$	$t_0(min)$	$t_{poliestireno}(min)$	$t_{uracil}(min)$
0,4	0,260	4,181	6,610
0,6	0,187	2,794	4,417
0,8	0,154	2,101	3,310
1,0	0,129	1,699	2,648
1,2	0,107	1,422	2,202

Com os dados da Tabela (4.1) é possível a determinação da fração de vazios do leito. Isso se dará por meio do método do primeiro momento. A molécula que permite determinar essa variável é o poliestireno, pois ele percolará apenas entre as partículas de sílica e não entre seus poros. A Figura (4.1) representa um cromatograma para o poliestireno, em fase móvel THF e fase estacionária sílica C₁₈ e temperatura de 25 °C. Por meio de injeções em vazões distintas, 0,4; 0,6; 0,8; 1,0 e 1,2 mL min⁻¹, é possível obter a fração de vazios do leito.

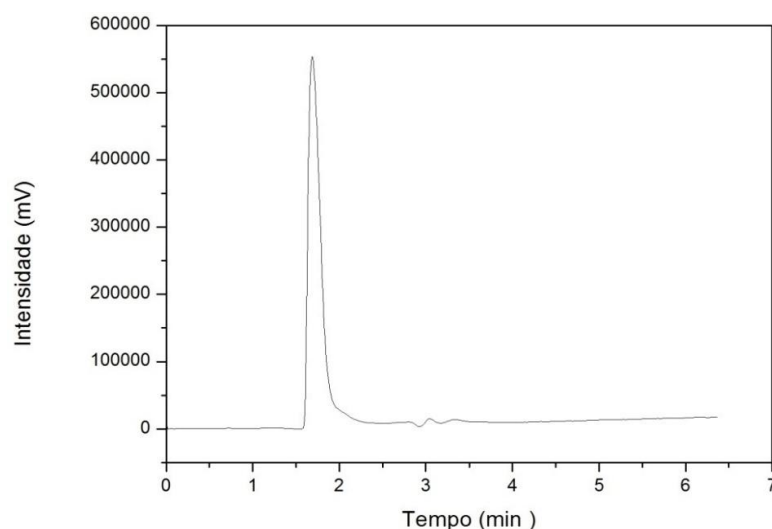


Figura 4.1 – Cromatograma resultante para a injeção de 20 µL de poliestireno 0,5g L⁻¹. Fase móvel THF, 25 °C, 1 mL min⁻¹, 220 nm.

De posse dos tempos de retenção do poliestireno, nas vazões anteriormente citadas, e as velocidades superficiais para as vazões de trabalho, foi possível obter a Figura (4.2).

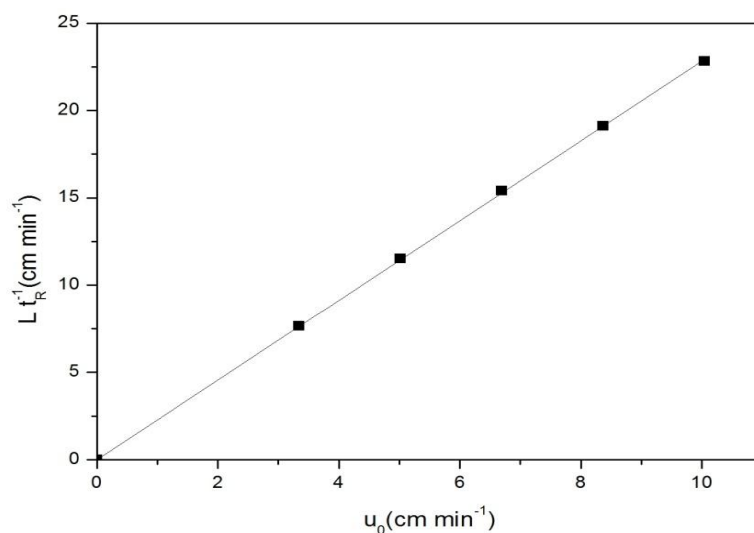


Figura 4.2 – Primeiro momento para o composto poliestireno. Fase móvel THF, 220 nm.

Da inclinação da reta da Figura (4.2) e a equação do primeiro momento, Equação (3.1), é possível obter o valor da fração de vazios do leito (ϵ). O valor encontrado para a fração de vazios do leito da coluna utilizada nesta Dissertação foi igual a 0,44. O valor do coeficiente de determinação para a reta da Figura (4.2) foi de 0,998.

De acordo com Baker *et al.* (2010) a fração de vazios do leito é um parâmetro chave para vários cálculos usados na descrição de colunas cromatográficas e representa uma boa descrição da estrutura da fase estacionária empacotada. Um valor típico encontrado para colunas bem empacotadas é ao redor de 0,40. Miyabe e Suzuki (1992) reportaram diferentes valores de frações de vazios do leito para colunas empacotadas com sílica C_{18} . As frações de vazios do leito encontradas pelos autores foram de 0,38 e 0,44, para partículas com diâmetro de 10 e 45 μm , respectivamente.

O valor de fração de vazios do leito encontrado nesta Dissertação está em conformidade com os valores relatados pelos autores Miyabe e Suzuki (1992).

4.1.2 Determinação da porosidade da partícula

A porosidade total foi determinada por meio do método dos momentos, com a injeção de uma molécula inerte de pequena massa molar, o uracil. Devido a não interação do analito com a fase estacionária e sua baixa massa molar, a molécula permeia por entre as partículas de sílica e entre os poros da mesma. As condições experimentais, ajustadas para a determinação da porosidade total, foram as mesmas utilizadas para a determinação da fração de vazios do leito.

A Figura (4.3) representa um cromatograma para a injeção da molécula de uracil. A fase móvel utilizada foi uma mistura binária na proporção 60/40 (v/v) de acetonitrila e água.

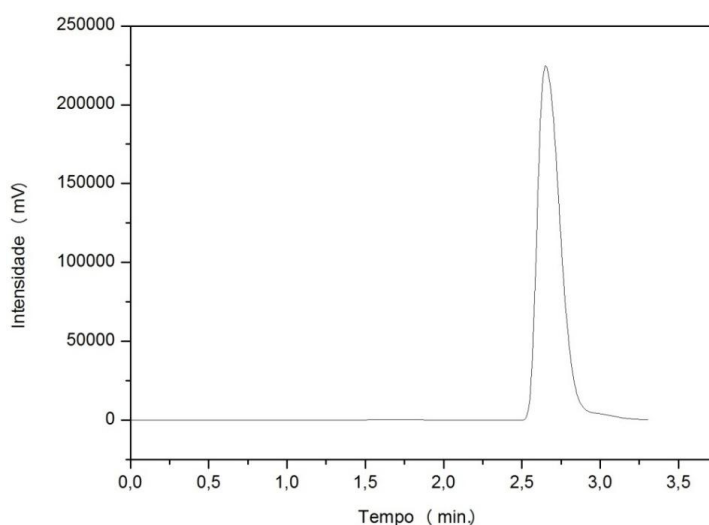


Figura 4.3 – Cromatograma resultante para a injeção de 20 μL de uracil $0,5\text{g L}^{-1}$. Fase móvel 60/40 (v/v) acetonitrila/água, 25 $^{\circ}\text{C}$, 1 mL min^{-1} , 254 nm.

A Figura (4.4) representa o gráfico do primeiro momento para o uracil, por meio do qual é possível obter o valor da porosidade total, e consequentemente a porosidade da partícula.

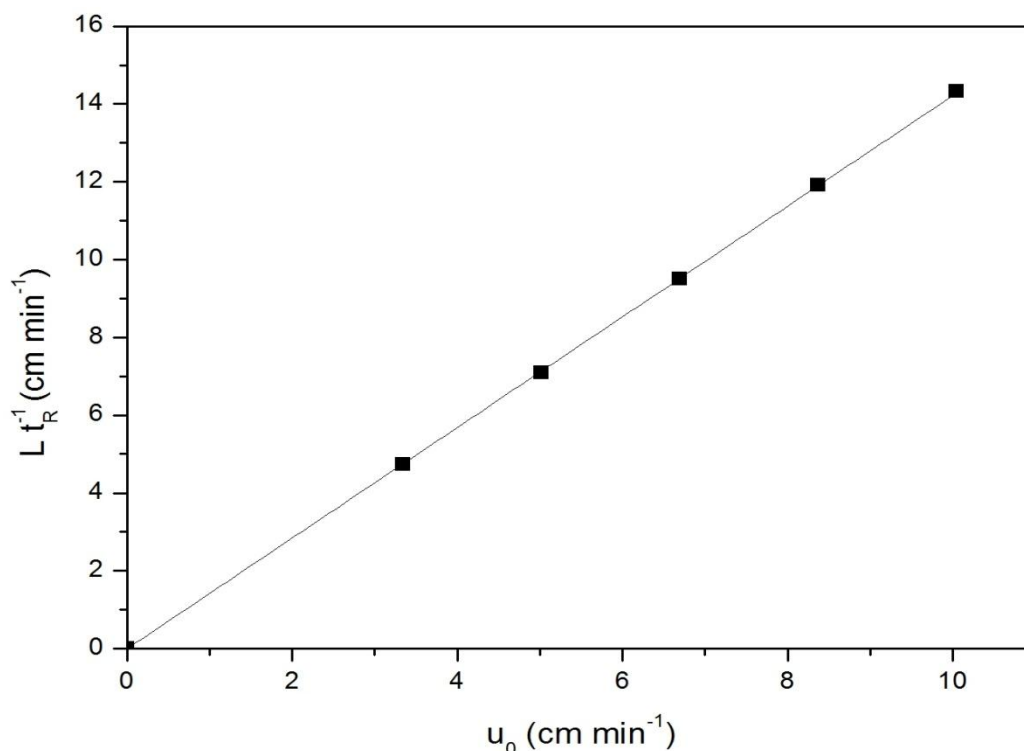


Figura 4.4 – Primeiro momento para o composto uracil. Fase móvel 60/40 (v/v) acetonitrila/ água, 254 nm.

Por meio da Figura (4.4) foi possível chegar ao valor da porosidade total, que para a presente Dissertação foi igual a 0,70. Com um coeficiente de determinação igual a 0,993. Urban (2007) relatou porosidades totais para colunas empacotadas com sílica C₁₈ de diâmetro de 3 µm igual a 0,36 e 0,86 para sílica de diâmetro de 5 µm.

Com o valor da porosidade total é possível, por meio da Equação (3.3), obter o valor da porosidade da partícula (ε_p).

$$\varepsilon_T = \varepsilon + (1 - \varepsilon)\varepsilon_p \quad (3.3)$$

Utilizando os valores de porosidade total e da fração de vazios do leito previamente determinados, conclui-se que o valor da porosidade da partícula é igual a 0,47. Miyabe (2009) reportou valores de 0,47 para porosidade da sílica C₁₈, com uma partícula de diâmetro 4,5 µm. Urban (2007) reportou valores de porosidade da partícula de C₁₈ igual a 0,49, para sílica C₁₈ com diâmetro médio de 5 µm.

O valor encontrado para esta Dissertação, 0,47, foi determinado para uma partícula adsorvente com diâmetro médio de 10 μm .

4.2 Testes preliminares para a determinação da fase móvel

4.2.1 A escolha da fase móvel

Para a eleição da fase móvel que mais se ajustaria ao estudo da viabilidade da separação do piperonal dos demais componentes presentes na síntese, foram realizados testes que consistiam na injeção de 20 μL de uma solução de etanol, contendo os compostos piperonal, safrol, isosafrol e terpinoleno, nas proporções relatadas por Braga (2007), expostos na Tabela (3.1). A concentração de todas as soluções preparadas foi de 0,5 g L^{-1} . Todas as injeções, para a determinação da fase móvel, ocorreram em 25 $^{\circ}\text{C}$. O cromatograma resultante das injeções era analisado em função da resolução obtida.

A primeira fase móvel testada foi o etanol sem a adição de água. O cromatograma resultante para a injeção da solução citada, a 25 $^{\circ}\text{C}$ pode ser observado na Figura (4.5). As condições experimentais da Figura (4.5), vazão igual a 1 mL min^{-1} , temperatura 25 $^{\circ}\text{C}$ e comprimento de onda igual a 230 nm, foram mantidas para as Figuras (4.6), (4.7), (4.8) e (4.9).

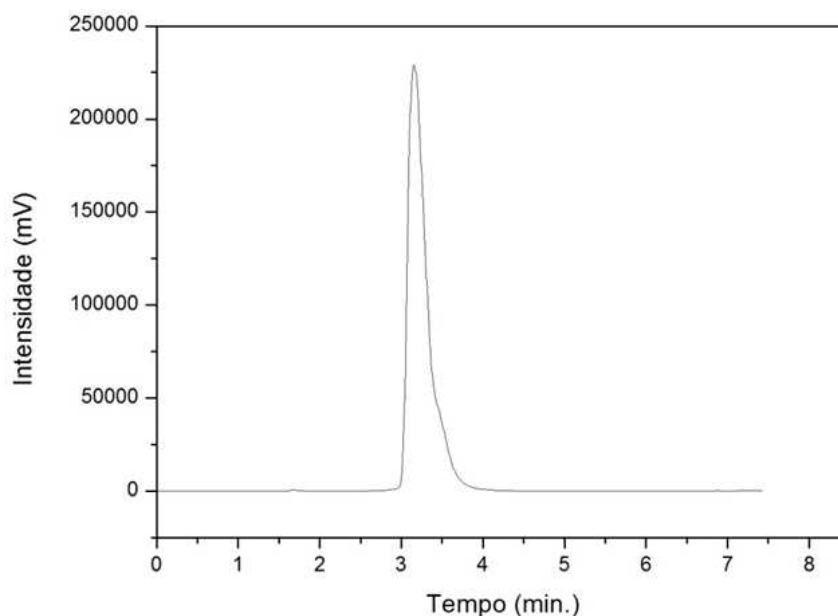


Figura 4.5 – Cromatograma resultante para a injeção de 20 μL da solução de piperonal, safrol, isosafrol, safrol e terpinoleno. Fase móvel etanol, 230 nm.

Como fica, claramente, ilustrado na Figura (4.1) a separação dos compostos com uma fase móvel 100% etanol é impossível, devido o tempo de retenção para todos os compostos ser o

mesmo e todos os picos estarem sobrepostos, ou seja, a interação dos compostos com a fase estacionária é a mesma, o que resulta em uma seletividade (α) igual.

A estratégia traçada, para poder haver a separação do piperonal dos demais componentes, foi a citada na literatura (MEYER, 2004; SCHIMDT-TRAUB, 2005), que é baseada na adição de água a fase móvel orgânica, procurando com isso, alterar a interação dos analitos com a fase estacionária. As proporções de água testadas foram: 10, 15, 20 e 30%.

A Figura (4.6) mostra o cromatograma resultante para a injeção da solução, com fase móvel binária 90/10 (v/v) etanol e água. Pode-se observar que a interação dos compostos com a fase móvel e fase estacionária mudou. O terpinoleno teve um incremento em seu tempo de retenção, assim como o safrol e isosafrol. Ainda, pode-se perceber que os compostos safrol e isosafrol possuem o mesmo tempo de retenção, o que torna sua separação impossível.

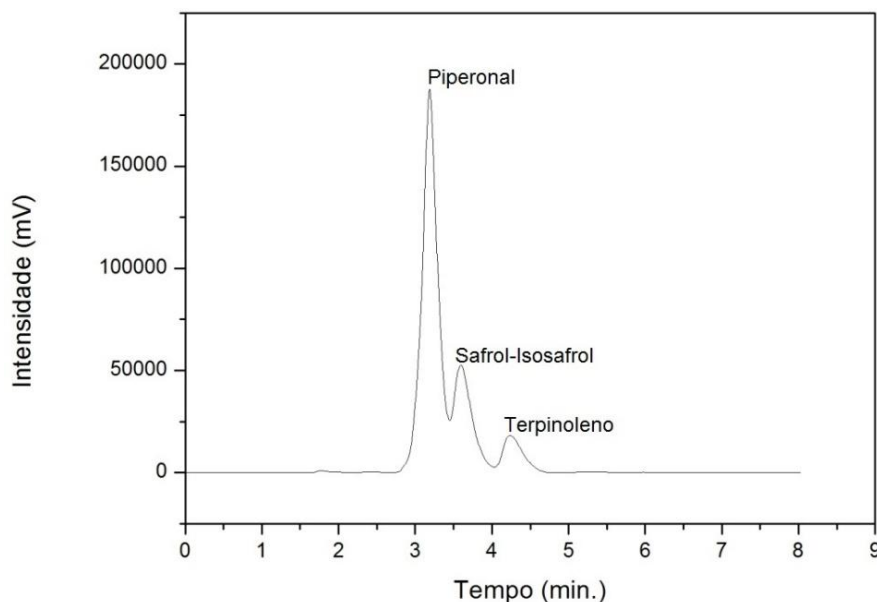


Figura 4.6 – Cromatograma resultante para a injeção de 20 μ L da solução de piperonal, safrol, isosafrol, safrol e terpinoleno. Fase móvel 90/10 etanol/água.

Comparando os cromatogramas das Figuras (4.5) e (4.6), pode-se perceber que com a adição de 10% de água à fase móvel, já nota-se que há uma separação entre os picos.

Para avaliar o efeito da adição de água ao sistema, com dados de parâmetros cromatográficos, foi optado pelo método da resolução. Collins (2006) relata que, para uma separação razoável entre dois componentes, o valor da resolução deve ser maior ou igual a 1,5.

Para obter os valores de resolução, expostos na Tabela (4.2), foi tomado o piperonal como composto referência, uma vez que esta Dissertação visa o estudo da viabilidade de sua separação dos demais compostos presentes na síntese orgânica do óleo essencial da pimenta longa.

Tabela 4.2 – Relação da resolução entre o piperonal e o safrol-isosafrol e terpinoleno, FM 90/10 (v/v) de etanol e água.

Composto _i / Composto _j	Resolução (R_s)
Piperonal / safrol – isosafrol	0,972
Piperonal / terpinoleno	2,147

Os dados da Tabela (4.2) comprovam que a completa separação dos piperonal do safrol-isosafrol não é possível, porém o terpinoleno apresenta um valor acima do mínimo recomendado.

A fase móvel seguinte testada foi a combinação 85/15 (v/v) etanol e de água. O procedimento experimental foi o mesmo aplicado ao caso anterior, ou seja, a injeção de uma solução 0,5 g L⁻¹, contendo uma mistura dos componentes em estudo.

A Figura (4.7), cromatograma resultante da injeção com fase móvel 85/15 (v/v), mostra uma melhor separação entre os picos do piperonal e safrol-isosafrol. Isso ocorreu devido a maior interação do safrol-isosafrol com a fase estacionária, com o incremento da água na fase móvel.

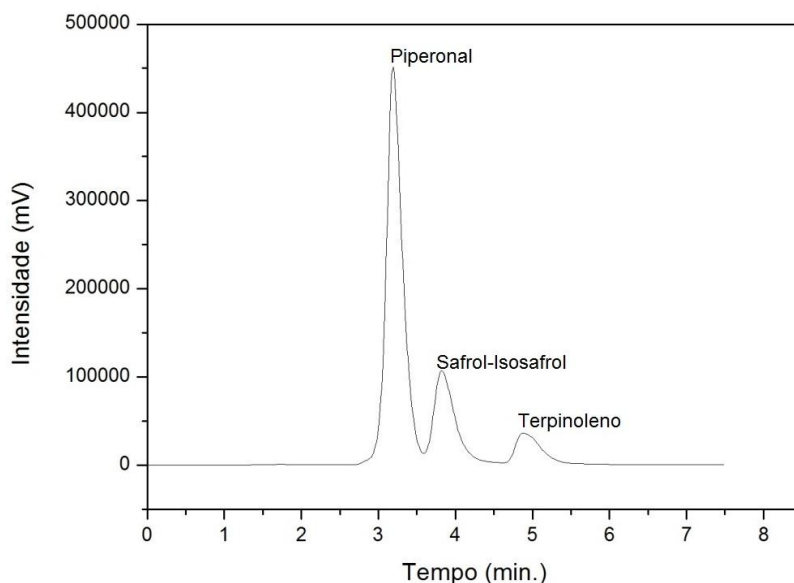


Figura 4.7 – Cromatograma resultante para a injeção de 20 µL da solução de piperonal, safrol, isosafrol, safrol e terpinoleno. Fase móvel 85/15 etanol/água.

A Tabela (4.3) representa as resoluções alcançadas com a fase móvel 85/15 (v/v). O que se pode perceber é que com 15% de água, foi possível alcançar um valor próximo a resolução mínima, para uma boa separação.

Tabela 4.3 – Relação da resolução entre o piperonal, safrol/isosafrol e terpinoleno. FM 85/15 (v/v) de etanol e água.

Composto _i / Composto _j	Resolução (R_s)
Piperonal/ safrol – isosafrol	1,469
Piperonal/ terpinoleno	3,486

Com o intuito de elevar o valor da resolução entre os componentes, foi adicionado mais 5% de água à fase móvel, perfazendo assim uma fase móvel composta de 80 % etanol e 20% água.

A Figura (4.8) ilustra o resultado alcançado com esta fase móvel. O que fica claro é que, quanto maior o volume de água presente na fase móvel, maior é a interação dos componentes safrol-isosafrol e terpinoleno com a fase estacionária, ao passo que o piperonal tende a seguir mais na fase móvel.

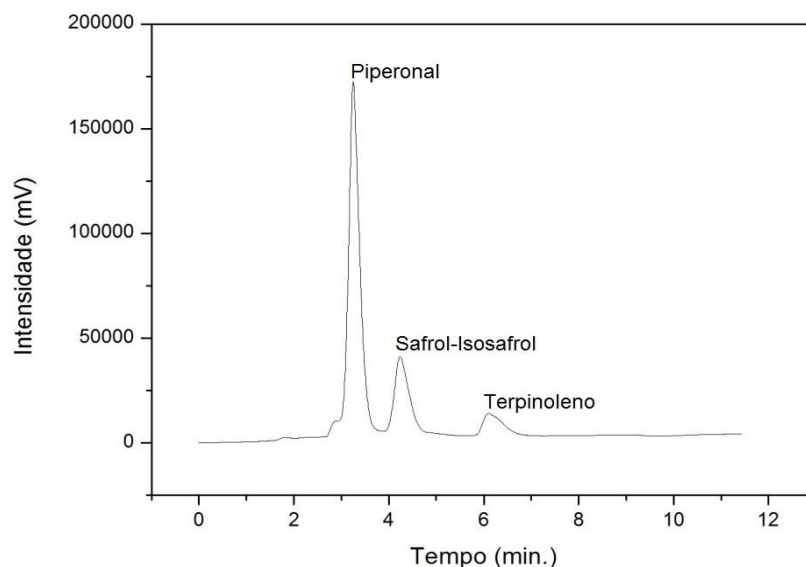


Figura 4.8 – Cromatograma resultante para a injeção de 20 µL da solução de piperonal, safrol, isosafrol, safrol e terpinoleno. Fase móvel 80/20 etanol/água.

A Figura (4.4) mostra, com clareza, que a os picos das amostras se afastam cada vez mais com a adição de água. O piperonal apresentou um tempo de retenção de 3,182 min para a fase móvel 90/10 (v/v), e para a fase móvel 80/20 (v/v) 3,245 min. Um incremento de 1,98%, o que mostra a pouca interação do composto com a fase estacionária. O tempo de retenção do safrol-isosafrol, com fase móvel 90/10 era de 3,591 min, ao passo que com fase móvel 80/20, o tempo sobe para 4,234, um incremento de 17, 91%. O composto de que mostra maior afinidade com a fase estacionária é o terpinoleno. Seu tempo de retenção varia de 4,233 min para 6,099 min, com

fase móvel 90/10 e 80/20, respectivamente. Isso representa um aumento de 44,08% no seu tempo de retenção.

A Tabela (4.4) representa as resoluções alcançadas com a fase móvel 80/20 (v/v). O que se pode perceber é que com 20% de água foi possível alcançar uma boa resolução para a separação dos compostos em estudo, ambos os valores de resolução foram acima do citado como limite para a separação completa; 1,5, citado por Collins (2006). O valor de resolução do safrol-isosafrol é 1,3 vezes acima do valor mínimo necessário para a separação, ao passo que a resolução para o terpinoleno é 3 vezes maior que a mínima. Isso resulta em uma completa separação dos componentes dos componentes em uma mistura. Ainda pode-se perceber que com o incremento de água a fase móvel a interação do terpinoleno com a fase estacionária sofre a maior elevação, o safrol-isosafrol aumentam a interação com a fase estacionária também, porém com menor intensidade, já o piperonal pouco se altera com as mudanças na fase móvel.

Tabela 4.4 – Relação da resolução entre o piperonal, safrol, isosafrol e terpinoleno. FM 80/20 (v/v) de etanol e água.

Composto _i / Composto _j	Resolução (R_s)
Piperonal / safrol – isosafrol	2,017
Piperonal / terpinoleno	4,672

Ainda assim, com o intuito de se obter uma resolução ainda maior e, com isso, ainda trabalhar com uma fase móvel mais barata (devido a maior quantidade de água), uma quarta fase móvel foi feita, que era constituída de 70% de etanol e 30% de água. O cromatograma resultante para a fase móvel 70/30 (v/v) está representado na Figura (4.9).

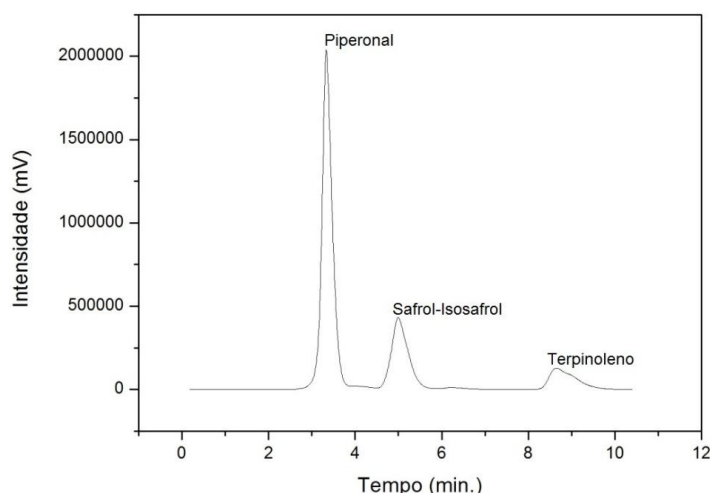


Figura 4.9 – Cromatograma resultante para a injeção de 20 µL de piperonal, safrol, isosafrol e

terpinoleno. Fase móvel 70/30 etanol/água.

A Figura (4.9) mostra, além da separação dos picos o 'alargamento' do pico do terpinoleno. Meyer (2004) explica o alargamento devido à elevada afinidade do composto com a fase estacionária, o que o leva a ter uma grande dificuldade em migrar para a fase móvel e sair da coluna.

A Tabela (4.5) expõe os valores da resolução alcançados para a fase móvel escolhida, 70/30 (v/v) etanol e água.

Tabela 4.5 – Relação da resolução entre o piperonal, safrol/isosafrol e terpinoleno, FM 70/30 (v/v) de etanol e água.

Composto _i / Composto _j	Resolução (R_s)
Piperonal / safrol – isosafrol	2,986
Piperonal / terpinoleno	6,900

A Tabela (4.5) mostra que, com 30% de água, foi possível aumentar mais a resolução entre os picos do piperonal e safrol-isosafrol, entretanto, mesmo com essa nova fase móvel, não foi possível separar o safrol do isosafrol presentes na mistura.

A fase móvel definida para os testes foi a fase binária contendo 30% de água em etanol. Uma fase móvel 60/40 (v/v) etanol e água foi testada, mas não pode ser utilizada, devido a alta pressão de trabalho do equipamento, 215,74 bar. Como relatado por Meyer (2004) a adição de água a solventes orgânicos causa uma elevação na viscosidade da mistura e, com isso, uma elevação na pressão.

4.3 Análise frontal na determinação de isotermas com fase móvel 70/30 (v/v) etanol e água

Conforme dados apresentados no Apêndice A; a separação do piperonal do safrol, isosafrol e terpinoleno é impossível quando a fase móvel utilizada é apenas etanol, pois os compostos apresentam interação com a fase estacionária, relativamente, iguais. Com isso, foram conduzidos experimentos com uma fase móvel binária, composta de 70% de etanol e 30% de água. Essa fase móvel foi escolhida a partir dos dados observados na seleção das fases móveis, onde foram diferentes porcentagens de água foram adicionadas ao etanol, com o intuito de eleger a melhor proporção.

As Figuras (4.10), (4.11), (4.12), (4.13) representam as curvas de ruptura para os padrões de piperonal, safrol, isosafrol e terpinoleno, respectivamente. A Figura (4.14) representa a curva de ruptura para a mistura dos produtos resultantes da síntese do piperonal, nas proporções relatadas

na Tabela (3.1). Os experimentos foram conduzidos sob temperatura controlada, 20 °C, vazão de 1 mL min⁻¹.

Da Figura (4.15) a (4.19) estão expostas as curvas de ruptura obtidas à 25°C. Com o intuito de obter um estudo termodinâmico do processo, foram obtidas curvas de ruptura a 30 °C, que estão expostas da Figura (4.20) a (4.24). Da Figura (4.25) a (4.29) pode-se observar as curvas de ruptura obtidas para a máxima temperatura estudada, 35 °C.

Os dados obtidos, por meio da análise da derivada primeira das curvas de ruptura, forneceram o valor do volume de inflexão, dado necessário para estabelecer a concentração de equilíbrio da fase estacionária, q , na Equação (2.17).

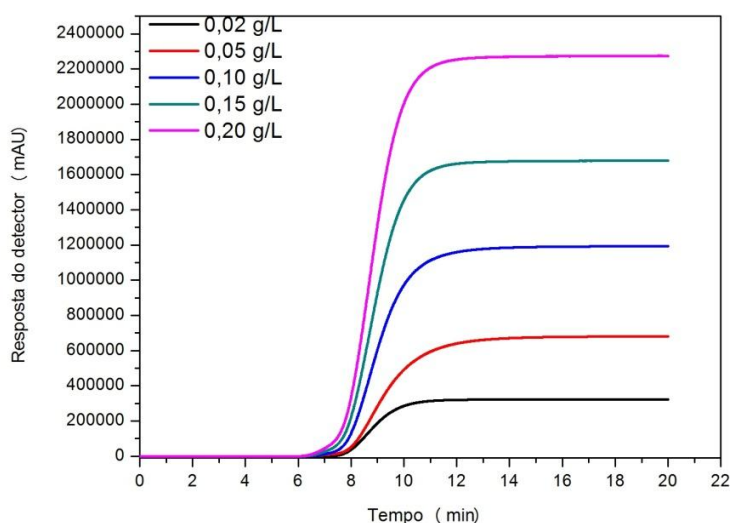


Figura 4.10 – Curva de ruptura para o piperonal à 20 °C.

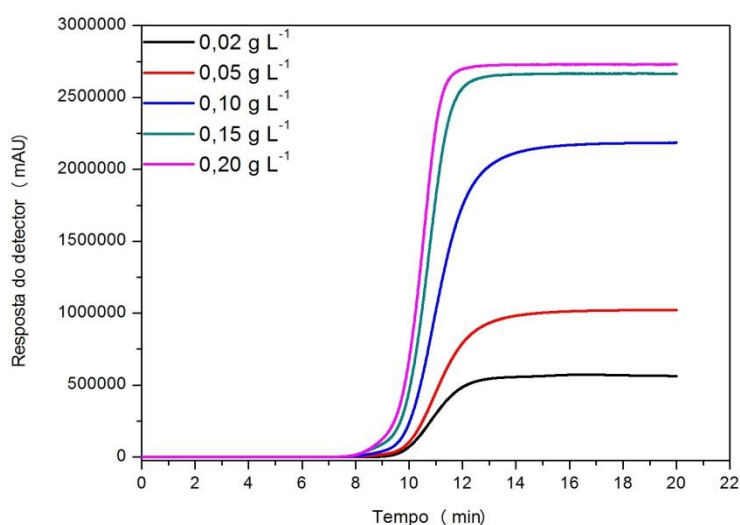


Figura 4.11 – Curva de ruptura para o safrol à 20 °C.

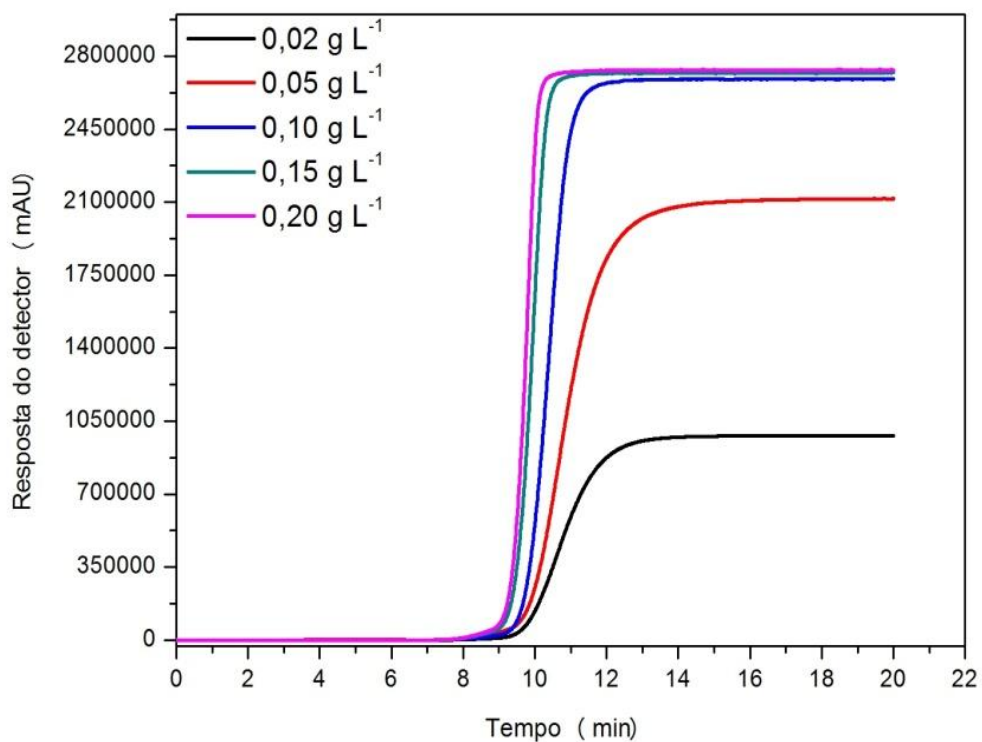


Figura 4.12 – Curva de ruptura para o isosafrol à 20 °C.

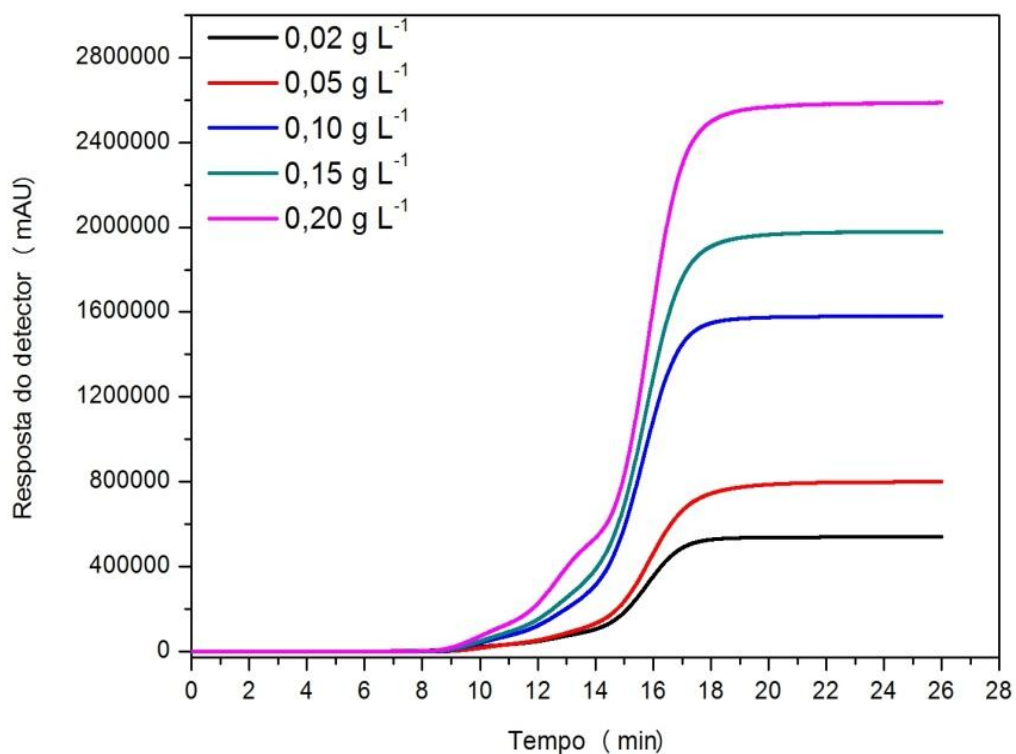


Figura 4.13 – Curva de ruptura para o terpinoleno à 20 °C.

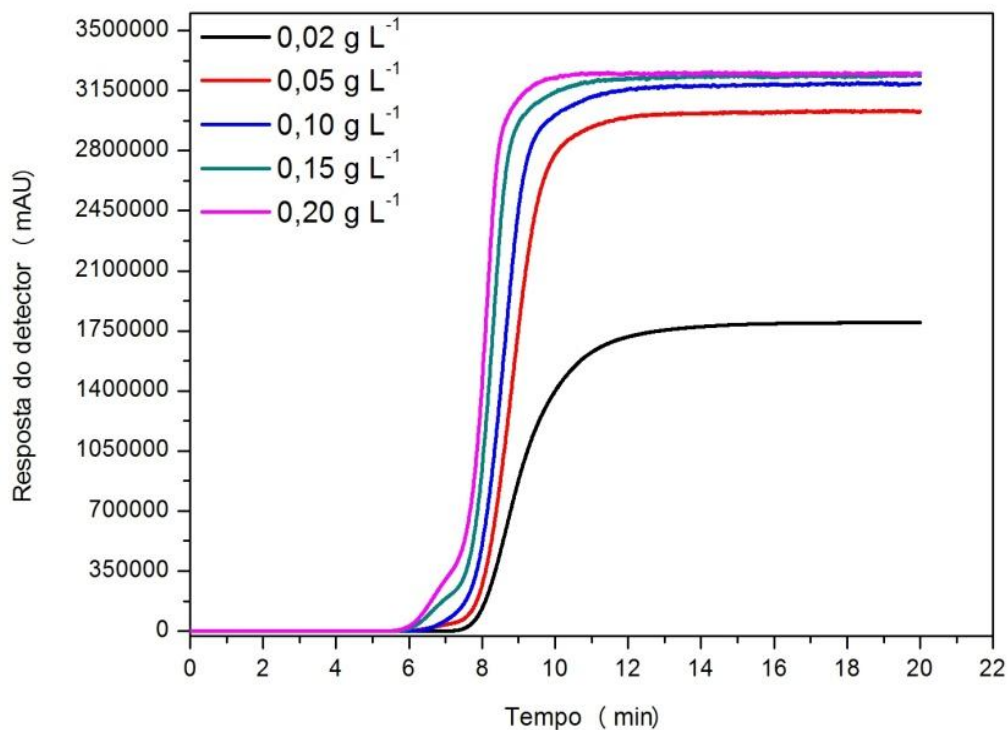


Figura 4.14 – Curva de ruptura para a mistura à 20 °C.

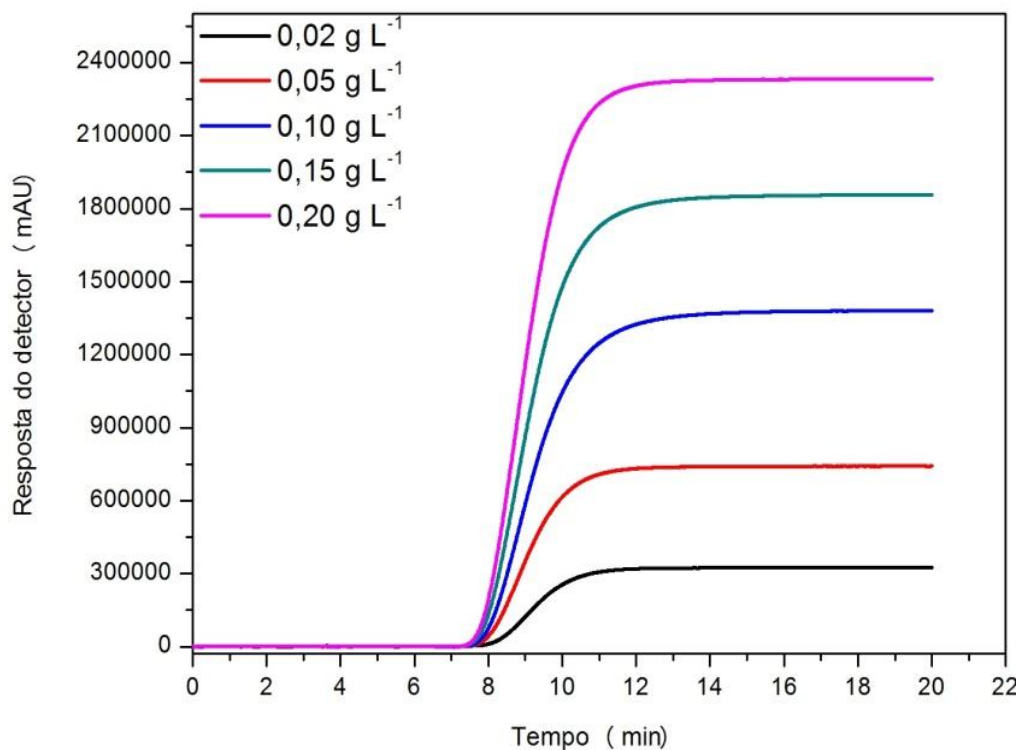


Figura 4.15 – Curva de ruptura para o piperonal à 25 °C.

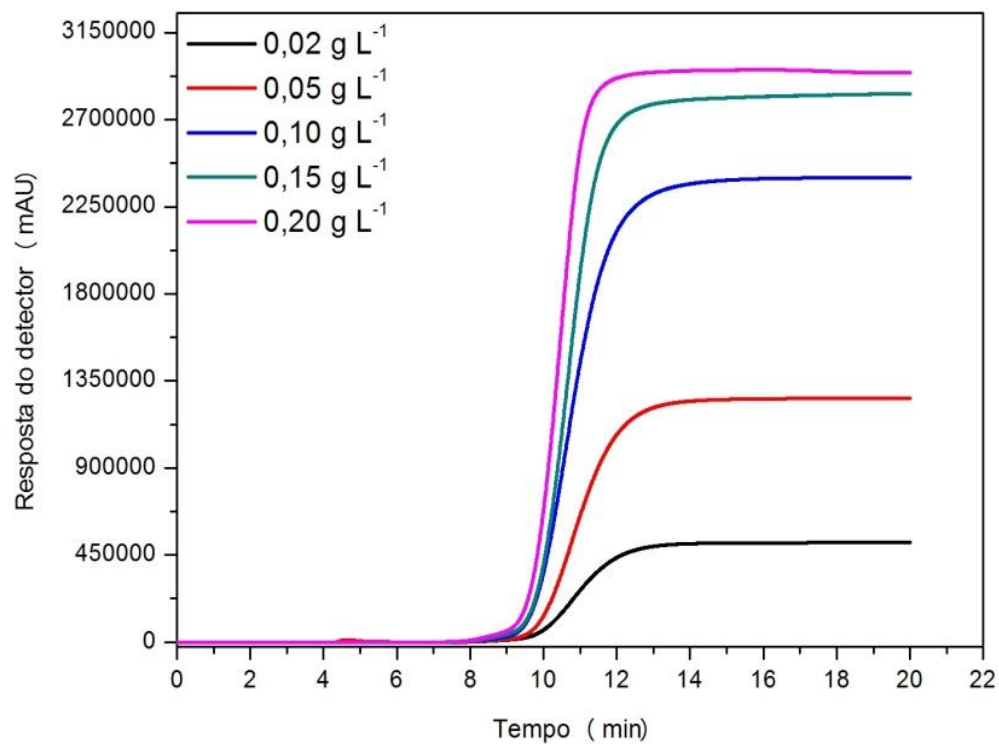


Figura 4.16 – Curva de ruptura para o safrol à 25 °C.

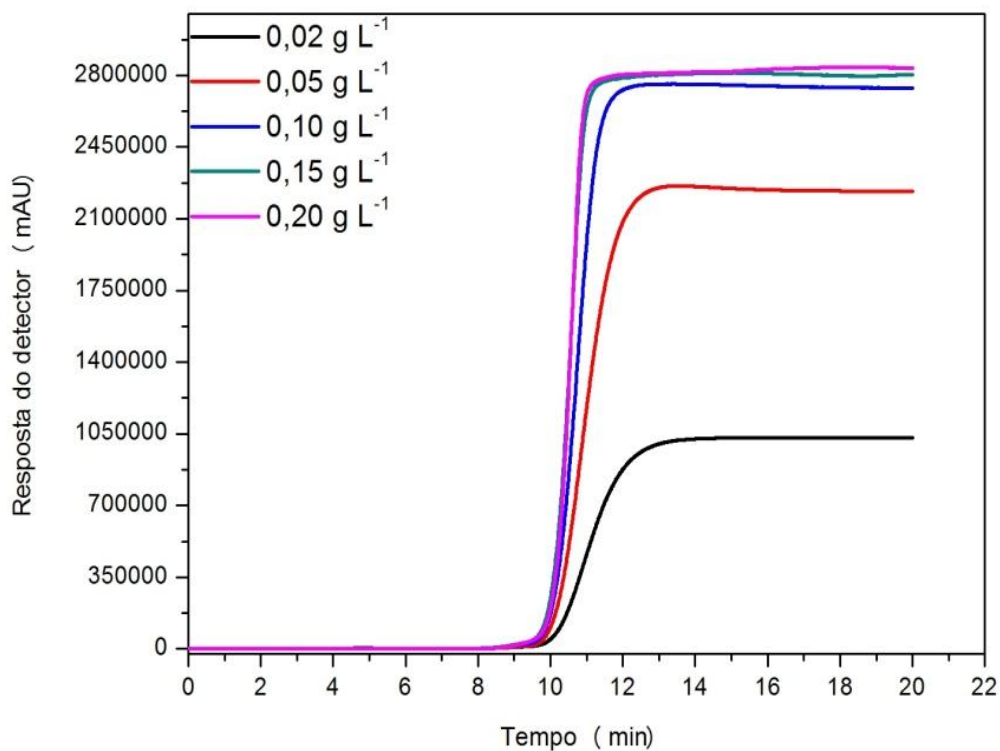


Figura 4.17 – Curva de ruptura para o isosafrol à 25 °C.

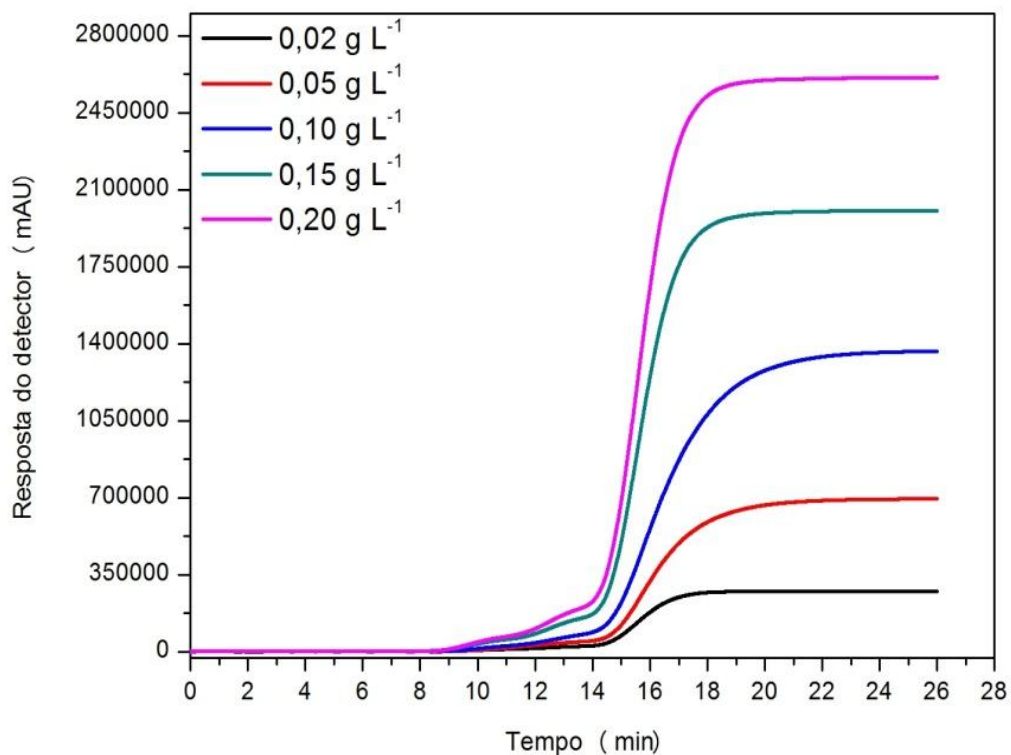


Figura 4.18 – Curva de ruptura para o terpinoleno à 25 °C.

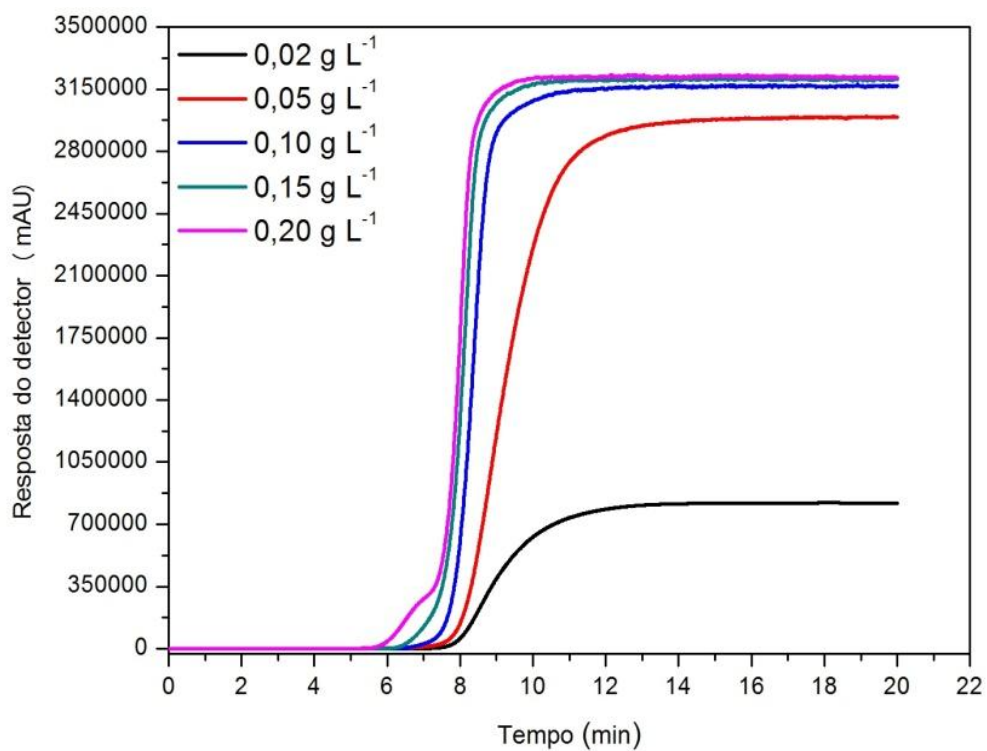


Figura 4.19 – Curva de ruptura para a mistura à 25 °C.

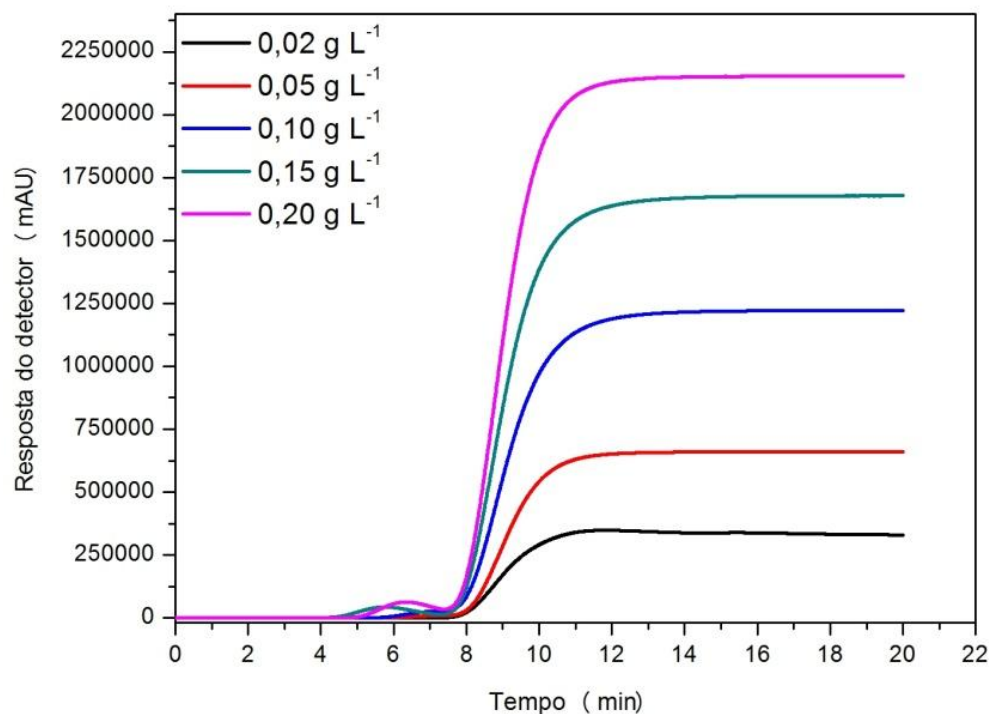


Figura 4.20 – Curva de ruptura para o piperonal à 30 °C.

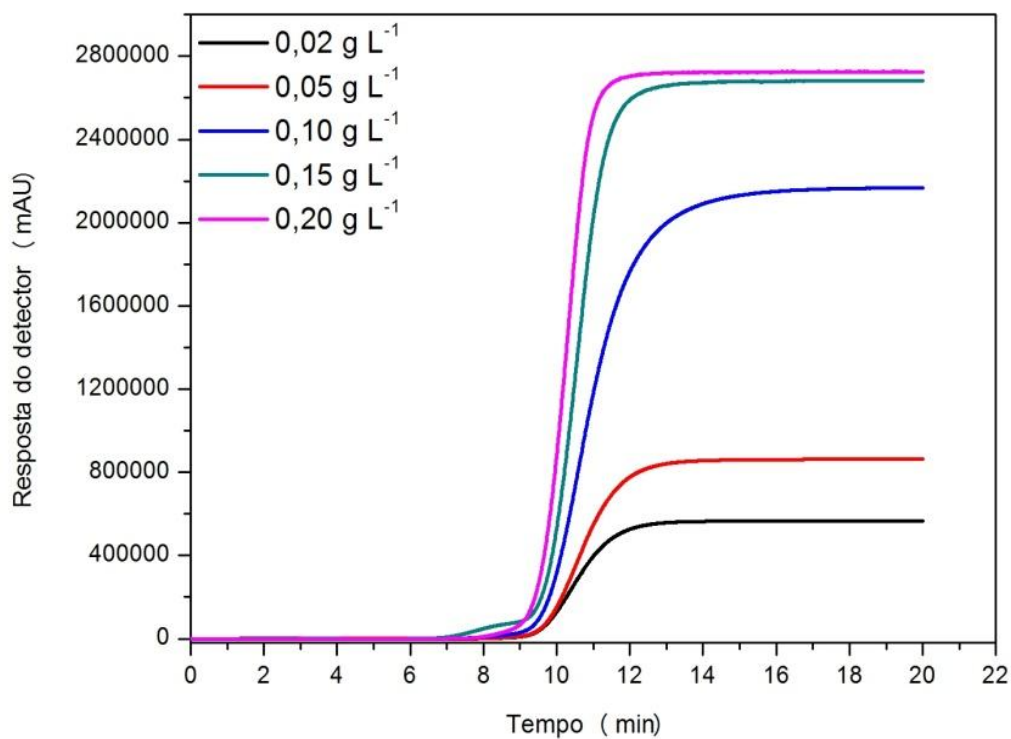


Figura 4.21 – Curva de ruptura para o safrol à 30 °C.

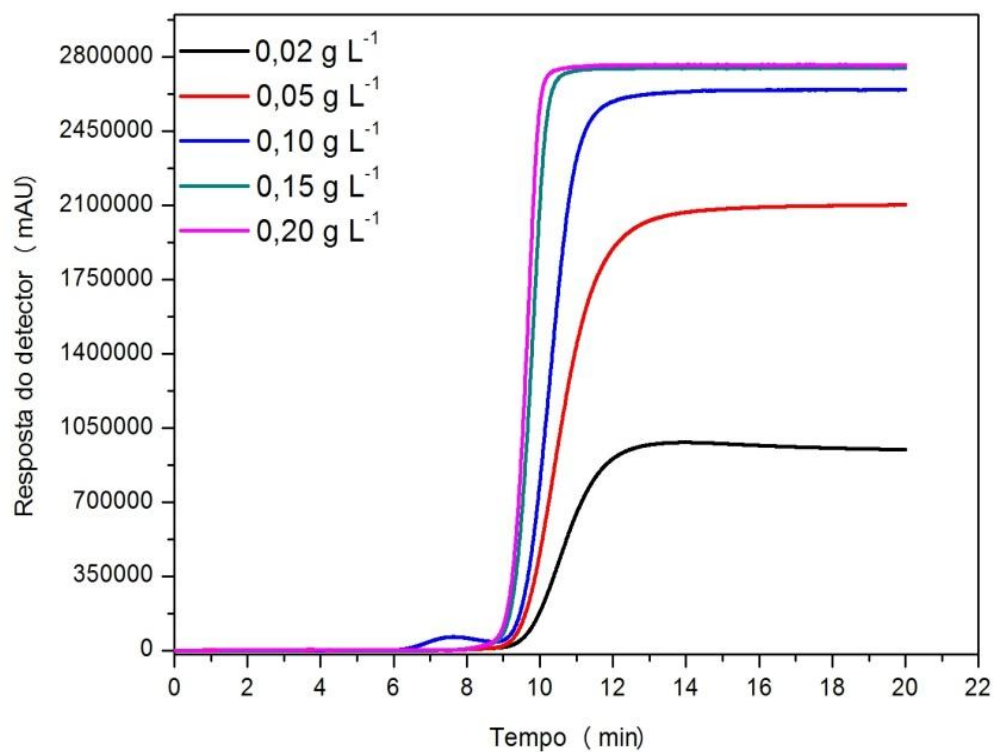


Figura 4.22 – Curva de ruptura para o isosafrol à 30 °C.

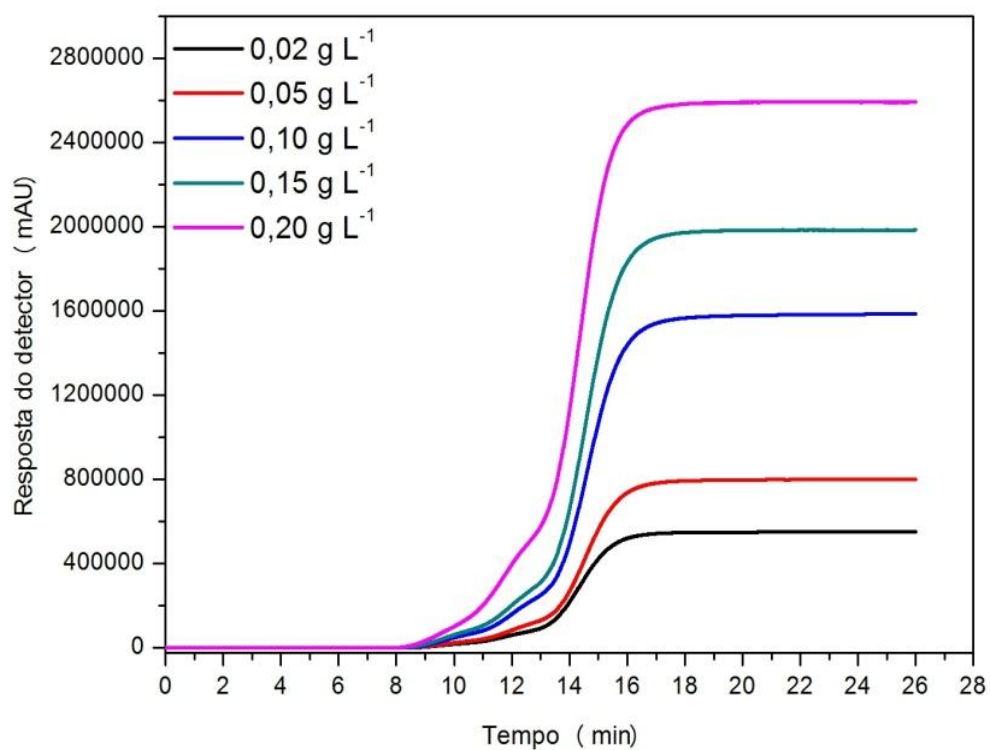


Figura 4.23 – Curva de ruptura para o terpinoleno à 30 °C.

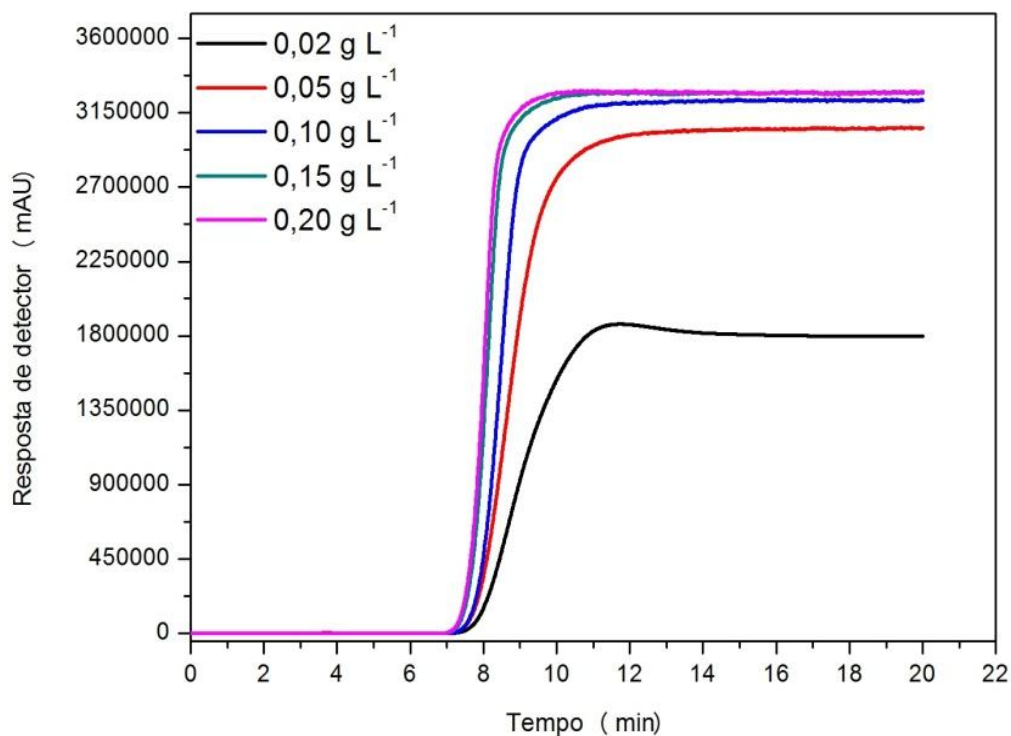


Figura 4.24 – Curva de ruptura para a mistura à 30 °C.

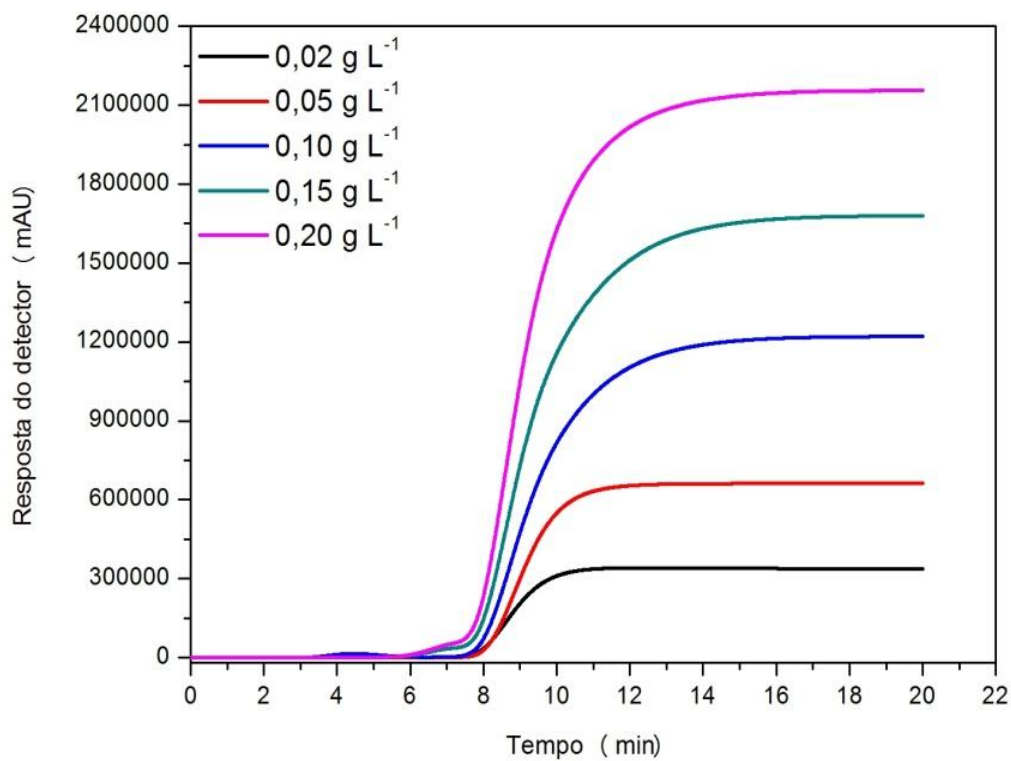


Figura 4.25 – Curva de ruptura para o piperonal à 35 °C.

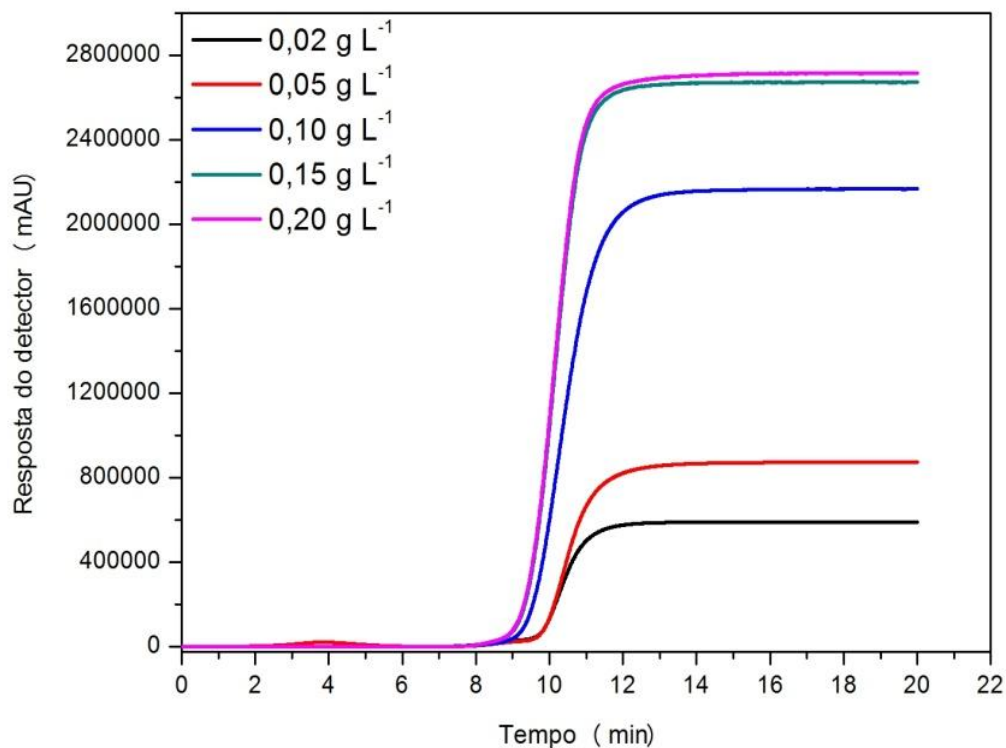


Figura 4.26 – Curva de ruptura para o safrol à 35 °C.

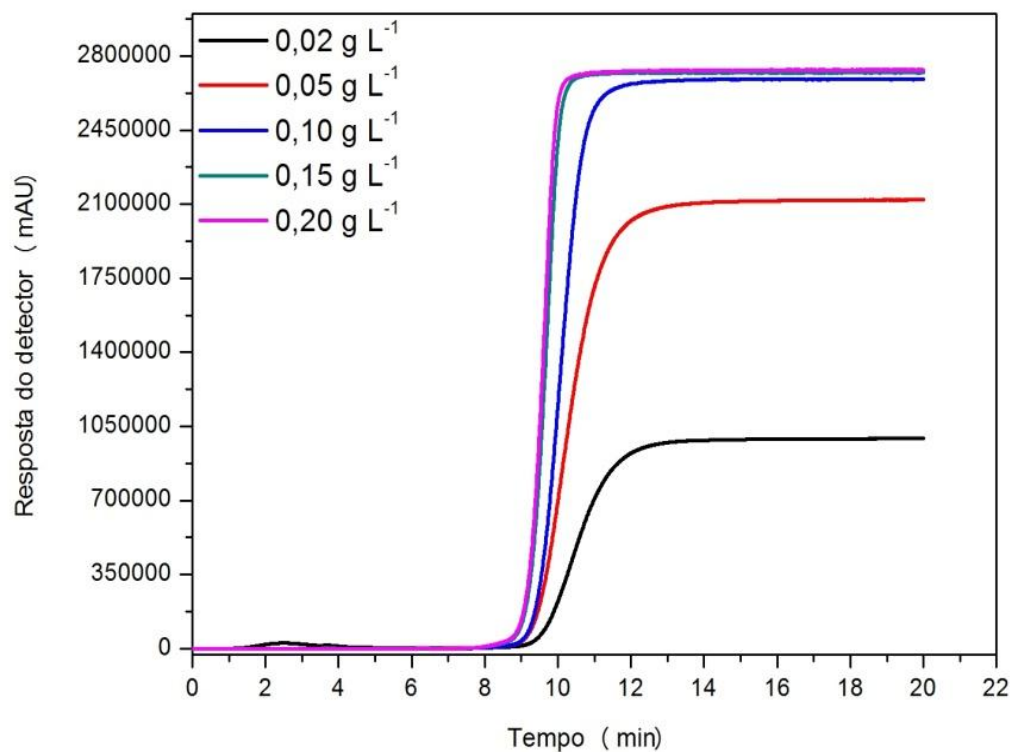


Figura 4.27 – Curva de ruptura para o isosafrol à 35 °C.

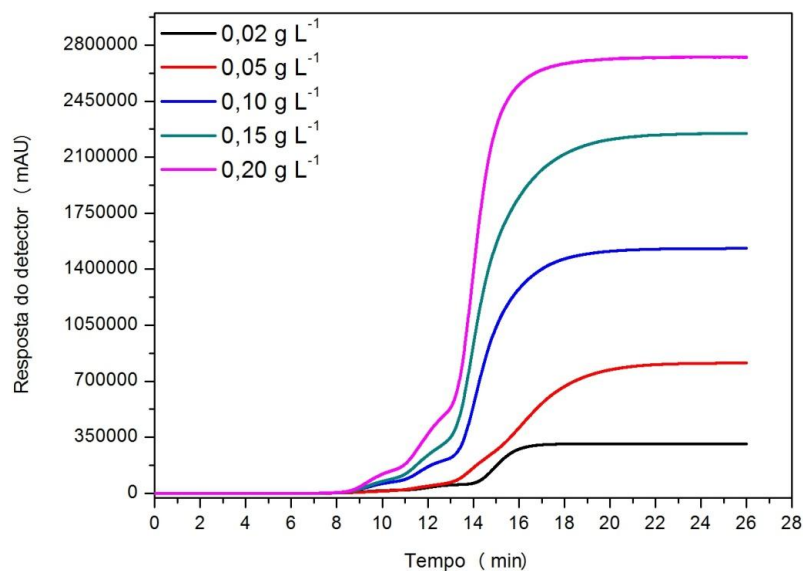


Figura 4.28 – Curva de ruptura para o terpinoleno à 35 °C.

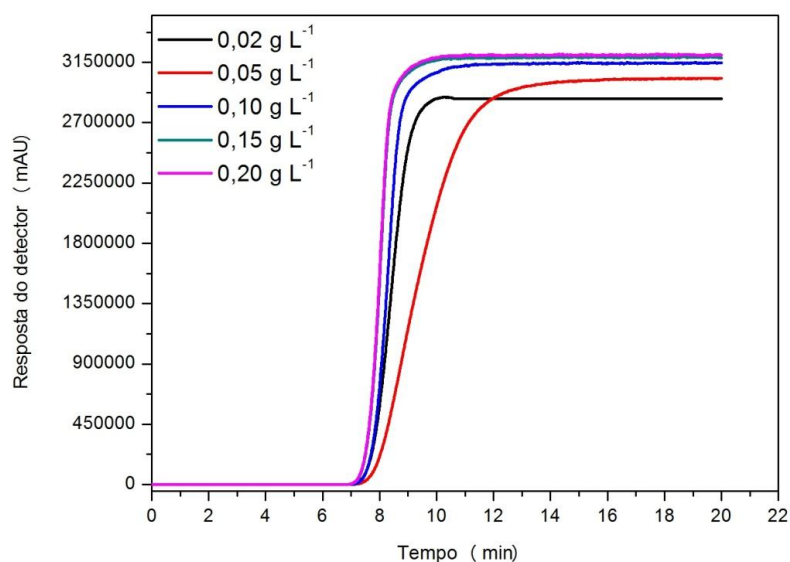


Figura 4.29 – Curva de ruptura para a mistura à 35 °C.

Para realizar a análise termodinâmica é necessário o estudo das constantes modificadas de Henry para diversas temperaturas. As temperaturas estudadas, como pode ser percebido, variaram entre 20 e 35 °C, com passo de 5 °C. Todas as curvas de ruptura obtidas para esta Dissertação estão expostas das Figuras (4.10) a (4.29).

Com os valores das constantes de Henry para cada temperatura é possível traçar o gráfico de van't Hoff, que caracteriza-se como o inverso da temperatura contra $\ln K_p$. Este método foi amplamente utilizado na literatura para a obtenção de grandezas termodinâmicas, como ΔG , ΔH e ΔS . Silva Junior (2003), Sartor (2006) e Nascimento (2012) obtiveram as grandezas

termodinâmicas dos enantiômeros do rolipram, cetamina e secnidazol, utilizando o gráfico de van't Hoff, porém os autores não utilizaram a técnica da análise frontal para a obtenção das constantes de equilíbrio termodinâmico ou constante modificada de Henry.

4.4 Isotermas lineares de adsorção com fase móvel 70/30 (v/v) etanol e água

Com os valores da concentração de equilíbrio na fase estacionária, q , é possível descobrir qual o modelo de isoterma mais se ajusta aos dados experimentais. Como a faixa estudada nesta Dissertação é de baixa concentração, o modelo que mais se ajustou aos dados experimentais foi o modelo de isoterma linear, Equação (2.16).

$$q = K_p c \quad (2.16)$$

As isotermas obtidas nas temperaturas de 20, 25, 30 e 35 °C servem como base para encontrar os valores das constantes modificadas de Henry, K_p , e assim, avaliar os dados da adsorção de um ponto de vista termodinâmico.

A Figura (4.30) representa as isotermas do piperonal, safrol, isosafrol, terpinoleno e da mistura dos compostos, segundo proporções relatadas por Braga (2007). As condições experimentais dos resultados obtidos na Figura (4.30) foram: temperatura igual a 20 °C, vazão de trabalho 1 mL min⁻¹ e fase móvel 70/30 (v/v) etanol e água.

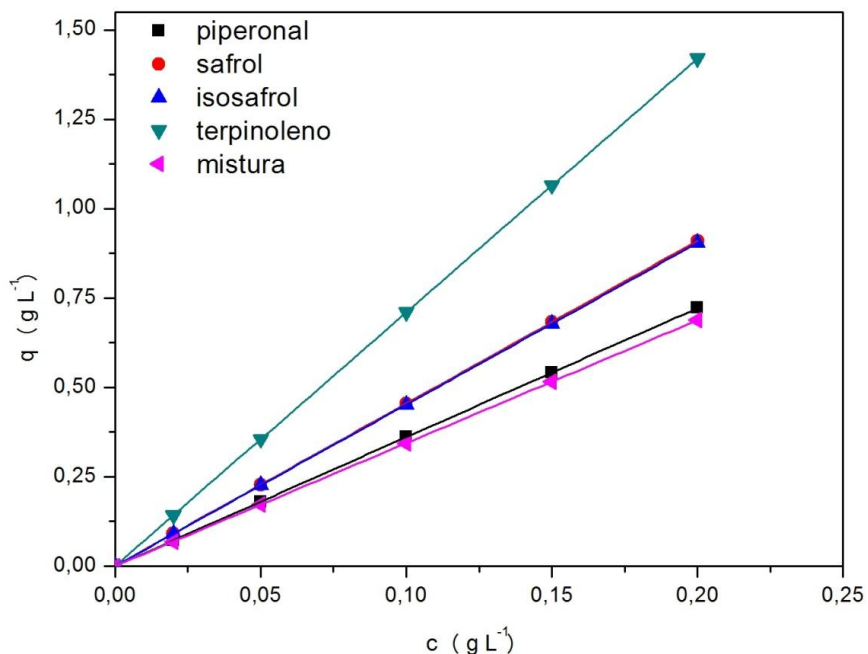


Figura 4.30 – Isoterma de adsorção para o piperonal; safrol; isosafrol; terpinoleno e mistura à 20 °C.

A Tabela (4.6) resume os dados obtidos por meio das isotermas, bem como os coeficientes de determinação das isotermas lineares, comparadas aos dados obtidos experimentalmente. Os valores de seletividade expostos na Tabela (4.7) sempre tomam o piperonal como composto base para a obtenção deste parâmetro.

Tabela 4.6 – Constantes modificadas de Henry para os compostos estudados à 20 °C, FM 70/30 (v/v) etanol e água.

Composto	K_p	Seletividade (α)	R^2
Piperonal	3,61	-	0,999
Safrol	4,55	1,260	0,991
Isosafrol	4,52	1,252	0,998
Terpinoleno	7,10	1,966	0,997
Mistura	3,44	-	0,999

Como comprovado, por meio da Figura (4.9) com a fase móvel etanol e água 70/30 (v/v) é possível obter separação entre os compostos, as constantes modificadas de Henry obtidas para a referida fase móvel corroboram com a afirmação. Os valores de seletividade exposto na Tabela (4.6) obtidos por meio da Equação (2.25) revelam que, em temperatura de 20 °C e fase móvel 70/30 (v/v) etanol e água, é possível obter a separação entre o piperonal e os demais compostos, uma vez que o valor aceitável para a separação é de 1,2 (Schmidt-Traub, 2005)

A Figura (4.31) reúne os valores obtidos das análises frontais para 25 °C e os traduz em meio de isotermas de adsorção.

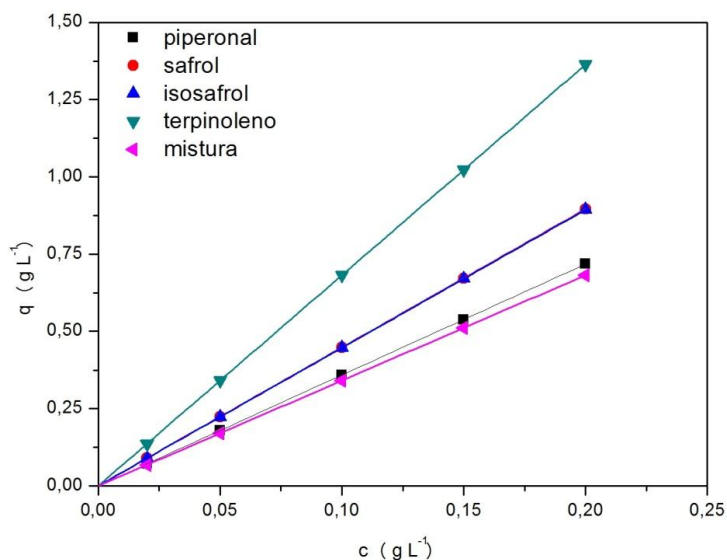


Figura 4.31 – Isoterma de adsorção para o piperonal; safrol; isosafrol; terpinoleno e mistura à 25 °C.

O mesmo procedimento utilizado para a Tabela (4.6) foi utilizado para a Tabela (4.7), que reúne os dados das isotermas obtidas em 25 °C.

Tabela 4.7 – Constantes modificadas de Henry para os compostos estudados à 25 °C, FM 70/30 (v/v) etanol e água.

Composto	K_p	Seletividade (α)	R^2
Piperonal	3,59	-	0,991
Safrol	4,48	1,247	0,995
Isosafrol	4,47	1,245	0,995
Terpinoleno	6,82	1,899	0,992
Mistura	3,41	-	0,994

Comparando os valores obtidos para as constantes modificadas de Henry, com fase móvel 100% etanol e temperatura de trabalho igual a 25 °C (Apêndice A), com os dados expostos na Tabela (4.7), pode-se observar que para o piperonal houve um decréscimo de 9,80% comparando o valor obtido com fase móvel 100% etanol e a fase móvel 70/30 (v/v) etanol e água, o safrol e isosafrol tiveram um acréscimo de 12 e 8,50%, respectivamente. O terpinoleno foi o composto que apresentou o maior incremento na interação com a fase estacionária com a variação da fase móvel, 44,49%.

A Figura (4.32) representa as isotermas de adsorção para os compostos estudados na temperatura de 30 °C.

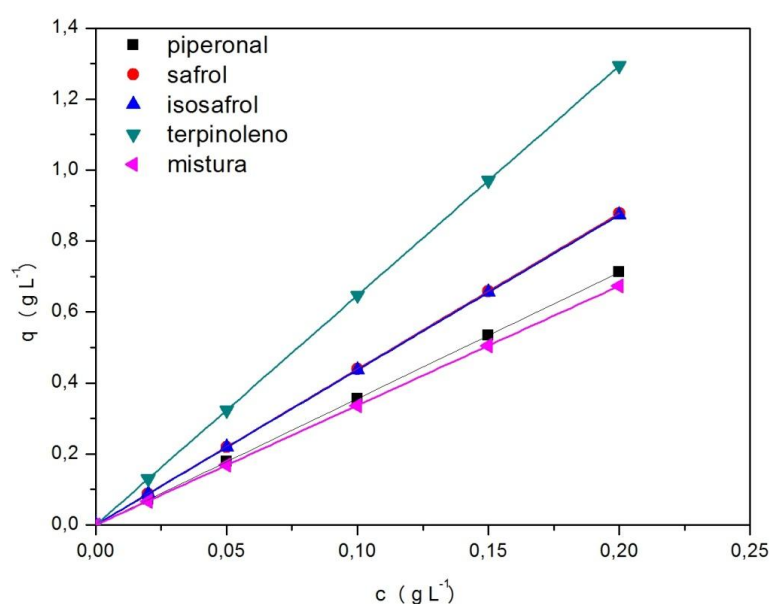


Figura 4.32 – Isoterma de adsorção para o, piperonal; safrol; isosafrol; terpinoleno e mistura à 30 °C.

A Tabela (4.8) foi obtida da mesma forma que as Tabelas (4.6) e (4.7), agrupando as constantes modificadas de Henry e os valores de seletividade, tomando o piperonal como composto base.

Tabela 4.8 – Constantes modificadas de Henry para os compostos estudados à 30 °C, FM 70/30 (v/v) etanol e água.

Composto	K_p	Seletividade (α)	R^2
Piperonal	3,56	-	0,998
Safrol	4,39	1,233	0,997
Isosafrol	4,37	1,227	0,997
Terpinoleno	6,47	1,817	0,994
Mistura	3,37	-	0,998

Como fica evidente nas Tabelas (4.6), (4.7) e (4.8), as constantes modificadas de Henry tendem a decrescer com o aumento da temperatura, segundo Ruthven (2008) isso se dá, devido à adsorção ser, em geral, um processo exotérmico.

A Figura (4.33) expõe a isoterma para os compostos na temperatura máxima estudada, 35 °C.

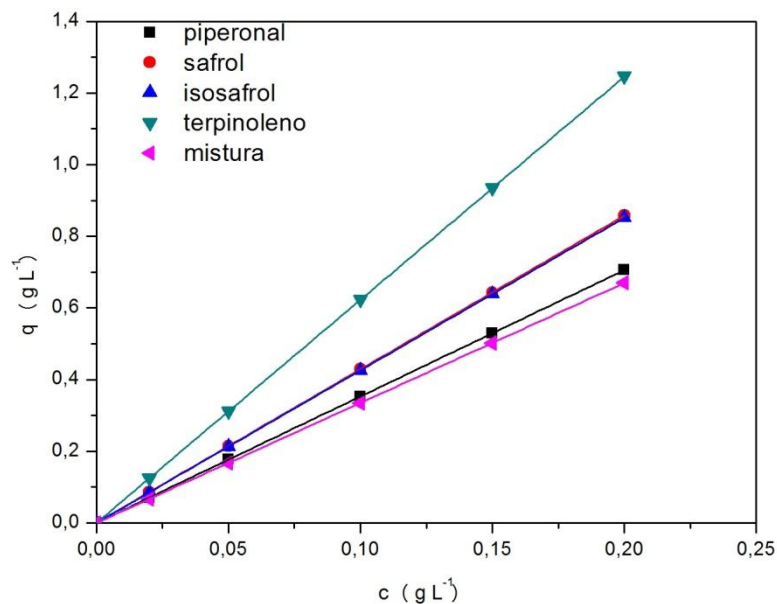


Figura 4.33 – Isoterma de adsorção para o, piperonal; safrol; isosafrol; terpinoleno e mistura à 35 °C.

Como Ruthven (2008) constatou em seus experimentos, as constantes modificadas de Henry tiveram uma tendência decrescente ao longo de todos os testes.

A Tabela (4.9) resume os dados das isotermas em 35 °C, bem como os valores da seletividade.

Tabela 4.9 – Constantes modificadas de Henry para os compostos estudados à 35 °C, FM 70/30 (v/v) etanol e água.

Composto	K_p	Seletividade (α)	R^2
Piperonal	3,53	-	0,998
Safrol	4,29	1,215	0,994
Isosafrol	4,26	1,207	0,999
Terpinoleno	6,23	1,765	0,989
Mistura	3,35	-	0,992

A Figura (4.34) expõe a queda nos valores da seletividade com o aumento da temperatura. Os valores foram obtidos tendo como molécula chave o piperonal. Pois é o composto de interesse.

Segundo Schmidt-Traub (2005), o valor mínimo aceitável para separações em cromatografia do tipo batelada, é 1,2, exposto na Figura (4.38) como LIC (Limite inferior de controle). Ainda, de acordo com Unger *et al.* (2005) o valor máximo recomendado, para cromatografia continua é de 2,0. O limite superior de controle (LSC), exposto na Figura (4.34), representa apenas uma ilustração de como deve se parecer um gráfico ilustrativo para a escolha da temperatura de trabalho. O valor de 2,0 citado por Unger *et al.* (2005) não é uma diretriz operacional de equipamentos, mas apenas uma recomendação, uma vez que o consumo de solventes deve ser algo considerado, e valores com (α) acima de 2,0 representam um maior consumo de fase móvel.

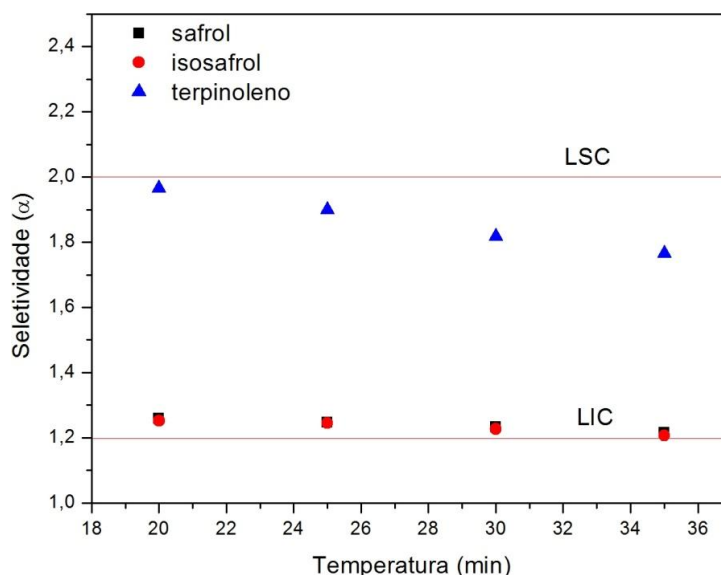


Figura 4.34 – Relação da seletividade com a temperatura.

4.5 Análise termodinâmica da adsorção

Os dados das Tabelas (4.6), (4.7), (4.8) e (4.9) forneceram os meios necessários para realizar o estudo termodinâmico do sistema.

As grandezas termodinâmicas, ΔG , ΔH e ΔS , foram obtidas por meio da Equação (2.10), que permite a construção do gráfico de van't Hoff, que é definido como o inverso da temperatura *versus* $\ln K_p$. Muitos autores utilizaram do gráfico de van't Hoff para obter as grandezas termodinâmicas em cromatografia líquida, entre eles Loun e Hage (1994); Seidel-Morgenstern e Guiochon (1993); Schlauch e Frahm (2001); Nascimento *et al.* (2012).

$$\ln K_p = -\frac{\Delta G}{RT} = -\frac{\Delta H}{RT} + \frac{\Delta S}{R} \quad (2.10)$$

O gráfico de van't Hoff para os dados obtidos, das isotermas de adsorção, está exposto na Figura (4.35).

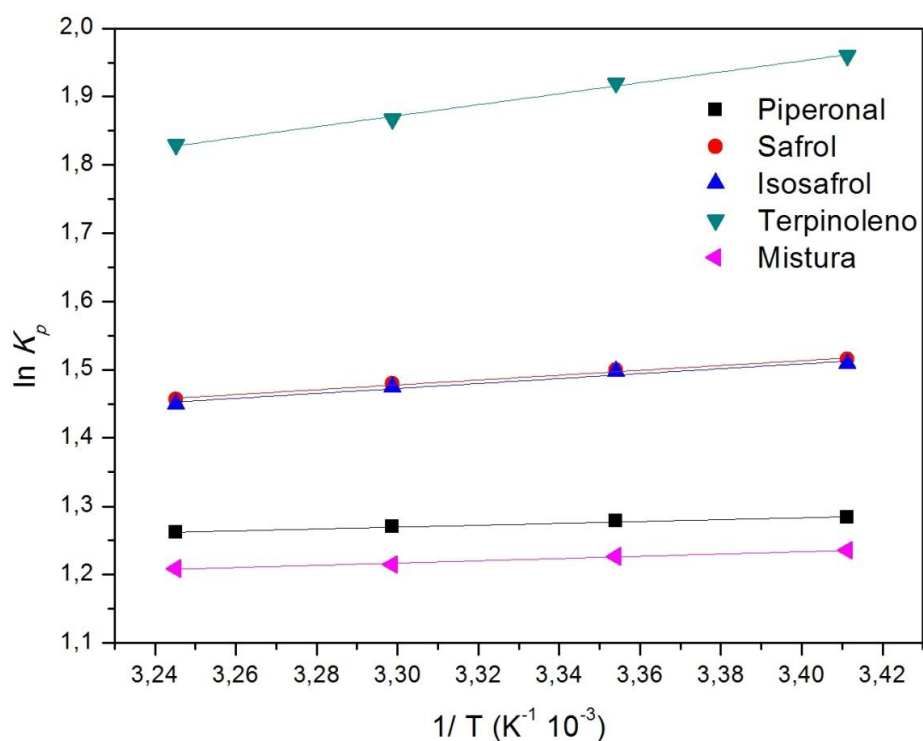


Figura 4.35 – Gráfico de van't Hoff para os compostos estudados.

A Figura (4.39) mostra que os dados apresentaram uma boa linearidade, o que é requerido para utilização do gráfico van't Hoff. Os coeficientes de determinação encontrados situaram-se entre 0,952 e 0,994, para o isosafrol e terpinoleno, respectivamente.

Os dados termodinâmicos obtidos estão resumidos na Tabela (4.10), que expõem os valores de ΔG , ΔH , ΔS e os coeficientes de determinação.

Tabela 4.10 – Dados termodinâmicos obtidos para os compostos piperonal, safrol, isosafrol, terpinoleno e mistura.

Composto	ΔG (KJ mol ⁻¹)	ΔH (KJ mol ⁻¹)	ΔS (J mol K ⁻¹)	R ²
Piperonal	-3,182	-1,134	6,812	0,983
Safrol	-3,717	-2,952	2,545	0,985
Isosafrol	-3,705	-3,002	2,338	0,952
Terpinoleno	-4,732	-6,682	-6,485	0,994
Mistura	-3,053	-1,373	5,587	0,982

A entalpia para todos os compostos avaliados apresentaram valores negativos, o que indica que o processo de adsorção é exotérmico. Alguns autores como Saha e Chowdhury (2011) e Schult e Epping (2005) citam que os valores de ΔH fornecem uma ideia sobre do tipo de adsorção envolvida no processo. Segundo os autores entalpias menores que 50 KJ mol⁻¹ representam uma fisissorção, ao passo que valores acima de 60 KJ mol⁻¹ caracterizam um processo de quimissorção. Os valores apresentados nesta Dissertação apresentam que o processo de adsorção é, claramente, fisissorção. Ruthven (2008) cita que a fisissorção tem baixas energias de adsorção, não especificando um valor, na região linear da isoterma a energia de adsorção é igual a entalpia (SEIDEL-MORGENSTERN e GUIOCHON, 1993).

O que pode-se perceber pela Tabela (4.10) é que a interação do composto com a fase estacionária reflete na entalpia, pois o piperonal, composto menos retido, apresenta o maior valor de entalpia, ao passo que o terpinoleno, composto mais retido, apresenta o menor valor. Os autores Loun e Hage (1994), Silva Junior (2003), Goossens *et al.* (2004), Sartor (2006) e Freitas (2009) também encontraram a mesma relação do tempo de retenção com a entalpia, o composto menos retido apresentou o maior valor de entalpia. Ainda, o piperonal, possui um baixo tempo de

retenção devido sua característica polar, se comparado com os demais, safrol, isosafrol e terpinoleno; uma vez que a sílica C₁₈ possui uma alta apolaridade. Por consequência, o composto mais apolar, terpinoleno, possui o maior tempo de retenção.

Para os dados obtidos nesta Dissertação, o composto com o menor tempo de retenção, piperonal, apresenta o maior valor de ΔH , ao passo que o composto com o maior tempo de retenção, terpinoleno, possui o menor valor de entalpia. Este comportamento indica que quanto menor for o valor da entalpia mais favorável é para o adsorbato permanecer no adsorvente.

Saha e Chowdhury (2011) explicaram que para que ocorra uma adsorção significativa é necessário que o valor da energia livre de Gibbs, para o processo, seja negativa. Valores negativos de ΔG relacionam a viabilidade e espontaneidade do processo de adsorção no sistema. Valores abaixo de zero para a energia livre de Gibbs, expostos na Tabela (4.10) corroboram com os valores de entalpia, mostrando que o processo é exotérmico (ANIRUDHAN e RADHAKRISHNAN, 2008; CALVETE *et al.*, 2010).

De acordo com Saha e Chowdhury (2011) valores negativos para a entropia sugerem um mecanismo de associação entre o adsorbato e adsorvente, fazendo com que este permaneça por mais tempo na fase estacionária, tendo assim um maior tempo de retenção. Isto pode claramente ser evidenciado na Tabela (4.10), onde o terpinoleno, composto mais retido, possui o menor valor de entropia. Stern *et al.* (2008) cita que valores negativos de entropia indicam aumento na ordem cromatográfica do sistema. Relacionando assim uma maior afinidade pela fase estacionária, ao passo que os valores positivos indicam uma maior afinidade pela fase móvel. Essa afirmação fica mais clara quando observados os valores de entropia da Tabela (4.10), o maior valor de entropia pertence ao piperonal, composto menos retido, e por consequência, possui maior afinidade com a fase móvel.

Como foi observado, os parâmetros termodinâmicos são influenciados pela temperatura. A temperatura foi controlada com o auxílio de um banho termostatzado com precisão de 0,5 °C. Devido essa possível variação na temperatura, existe um erro associado a constante modificada de Henry e, consequentemente aos parâmetros termodinâmicos. Supondo que houvesse uma variação de 1 °C no sistema e calculando o erro associado a essa variação é possível chegar a conclusão que o erro máximo na variação de entalpia é de 7,26%. A variação da entropia apresentou um erro maior, para a mesma variação de 1 °C, o maior erro calculado foi de 10,77%. Isso comprova a não separação dos compostos safrol e isosafrol, pois os mesmos podem ter os valores de entalpia e entropia iguais e a pequena variação apresentada na Tabela (4.10) pode apenas representar o erro inerente a precisão do banho.

Uma vez que foram obtidos os valores das constantes modificadas de Henry para o piperonal, safrol, isosafrol e terpinoleno, nas temperaturas de 20, 25, 30 e 35 °C, torna-se possível traçar um gráfico de $\ln(\alpha)$ versus $1/T$, que permitirá encontrar os valores de $\Delta(\Delta H)$ e $\Delta(\Delta S)$ para o sistema. Estes valores são caracterizados como a variação entre as entalpias de um composto chave, neste caso o piperonal, e um segundo composto adsorvido.

Os valores de seletividade foram calculados pela Equação (2.25), que descreve a seletividade como sendo a razão entre duas constantes de Henry. A molécula eleita como referência, para esta Dissertação, foi o piperonal. Uma vez que é a molécula de interesse.

Por meio da Equação (2.14) é possível a construção da Figura (4.36), que representa a seletividade em função do inverso da temperatura.

$$\ln \alpha = -\frac{\Delta(\Delta H)}{RT} + \frac{\Delta(\Delta S)}{R} \quad (2.14)$$

Com os valores de $\Delta(\Delta H)$ e $\Delta(\Delta S)$ é possível calcular o valor da temperatura isosseletiva (Equação 2.15), que se dá quando a seletividade entre dois compostos é igual a 1, ou seja, a temperatura que não há separação, e acima dela, a ordem de eluição dos componentes é invertida.

$$T_{iso} = \frac{\Delta(\Delta H)}{\Delta(\Delta S)} \quad (2.15)$$

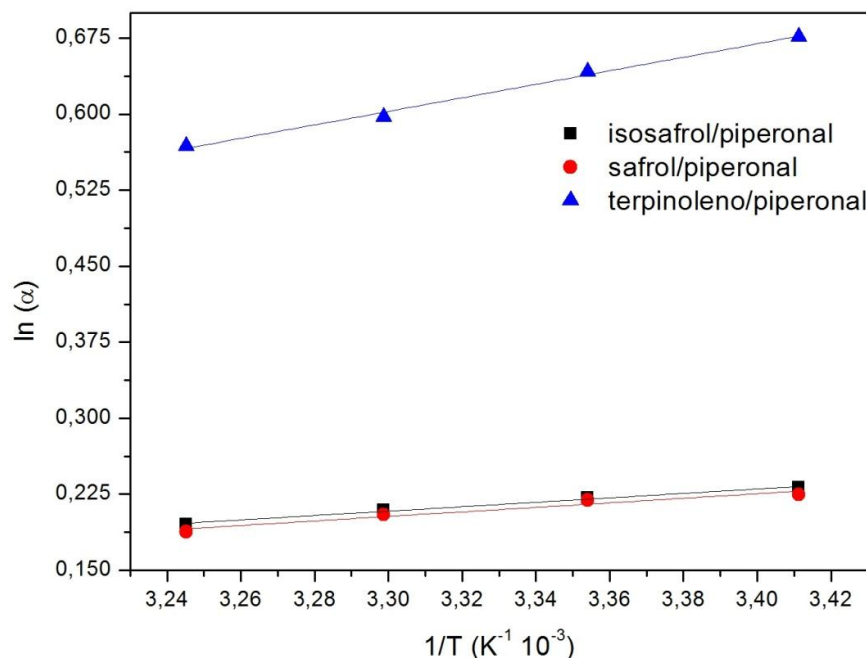


Figura 4.36 – Gráfico de van't Hoff em função da seletividade e temperatura.

A Tabela (4.11) resume os dados termodinâmicos obtidos por meio da Figura (4.40) e Equações (2.14) e (2.15). Os valores representam a variação de entalpia e entropia, tendo como composto base o piperonal.

Tabela 4.11 – Dados termodinâmicos obtidos por meio da seletividade entre os compostos e o piperonal.

$K_{pi}/K_{pip.}$	$\Delta(\Delta H)$ (KJ mol ⁻¹)	$\Delta(\Delta S)$ (J mol ⁻¹)	T_{iso} (°C)	R ²
Safrol/piperonal	-1,818	-4,266	153,01	0,990
Isosafrol/piperonal	-1,868	-4,474	144,37	0,951
Terpinoleno/piperonal	-5,548	-13,296	144,12	0,995

A T_{iso} calculada foi igual a 153,01; 144,37 e 144,12 °C para o safrol, isosafrol e terpinoleno, respectivamente. O esperado seria que a T_{iso} para o safrol e isosafrol fossem parecidas, a variação entre elas pode ser explicada pelo coeficiente de determinação. A variação da seletividade com a temperatura, para o isosafrol, não é tão linear quanto o safrol. Nestas temperaturas os termos entálpicos e entrópicos são balanceados, e consequentemente não há separação entre os compostos. Temperaturas acima das citadas na Tabela (4.11) levam a uma inversão na ordem de eluição dos compostos. Experimentos com temperaturas iguais a T_{iso} são duplamente inviáveis, primeiro devido a não separação e segundo, o manual da ThermoQuest, fornecedora da coluna, não recomenda trabalhar com temperaturas acima de 60 °C.

Capítulo 5

5 Conclusões e Sugestões

Neste trabalho foi aplicada a metodologia da análise frontal para cromatografia líquida de alta eficiência para obter as isotermas de adsorção, na região linear, dos compostos majoritários da síntese do piperonal a partir do óleo essencial da pimenta longa e, com isto, estudar a viabilidade da aplicação da metodologia na separação do piperonal do safrol, isosafrol e terpinoleno, compostos oriundos da síntese orgânica do piperonal.

Como fase estacionária foi utilizada a sílica C₁₈. A fase móvel principal do estudo é composta por uma mistura binária de etanol e água na proporção (70/30 v/v). A fase móvel, etanol e água, foi escolhida após uma série de testes para decidir a melhor proporção de água presente na fase móvel. A proporção definida mostrou-se aplicável ao sistema, pois foram obtidos valores de resolução e seletividade que permitiram a completa separação do isosafrol, safrol e terpinoleno do piperonal.

A otimização da fase móvel mostrou que apenas com a adição de água é possível sair de um estado de não separação para um de completa separação, como ficou evidenciado nos resultados obtidos. Os valores de seletividade encontrados para fase móvel 100% etanol, não atendem ao requisito proposto na literatura de cromatografia líquida, ou seja, um valor acima de 1,2. Com a adição de água na fase móvel pode-se perceber que os compostos, safrol, isosafrol e terpinoleno apresentaram uma crescente afinidade com a fase estacionária, ao passo que o piperonal manteve-se quase inalterado. Isto fez com que a água propiciasse a purificação do produto resultante da síntese do piperonal, a partir do óleo essencial da pimenta longa. Esta crescente afinidade com a fase estacionária.

O que pode-se perceber, por meio da Figura (4.34) é que a melhor temperatura de trabalho situa-se em 25 °C, pois apresenta a melhor faixa de resolução e seletividade entre os componentes.

Os parâmetros físicos da coluna, como fração de vazios do leito, porosidade total e porosidade da partícula, mostram-se em conformidade com dados encontrados por Miyabe e Suzuki (1992), estes autores relataram um valor igual a 0,44 e 0,38 para a fração de vazios do leito, para uma sílica C₁₈ com diâmetro médio de partícula de 10 e 45 µm, respectivamente. Nesta Dissertação o valor encontrado foi 0,44, e o diâmetro médio da partícula adsorvente é de 10 µm.

Os autores Miyabe e Suzuki (1992) utilizaram uma metodologia diferente para a obtenção deste parâmetro. Na presente Dissertação foi utilizado o método do primeiro momento. A partícula inerte injetada no sistema cromatográfico foi o poliestireno. Tal molécula mostrou-se útil como traçador para este fim, uma vez que sua alta massa molar a permite percolar apenas entre as partículas adsorvente, e não permear por seus interstícios.

A porosidade da partícula de sílica C₁₈, para a sílica utilizada nesta Dissertação, é igual a 0,47, o mesmo valor foi relatado por Miyabe (2009).

A metodologia utilizada para a determinação das isotermas de adsorção foi a Análise Frontal. Este método já foi muito discutido na literatura, como sendo uma das melhores ferramentas para a obtenção de isotermas. Pois, além da alta precisão, ele é de fácil automação. A desvantagem citada na literatura é o excessivo gasto de solventes.

A Análise Frontal permite, também, a determinação das constantes modificadas de Henry. Quando se trabalha na região linear da isoterma.

Por meio dos dados fornecidos pela Análise Frontal e isotermas de adsorção, foi possível conduzir um estudo termodinâmico do sistema, estimando o ΔG , ΔH e ΔS .

A análise termodinâmica da adsorção é uma ferramenta útil para entender o mecanismo de adsorção no sistema, além de ser um dado a mais para explicar o mecanismo de separação dos componentes dentro da cromatografia líquida. Também, mostra o quão forte pode ser a interação de um composto com a fase estacionária e fase móvel.

O gráfico de van't Hoff, como já relatado por outros autores, é importante para a avaliação termodinâmica, pois simplifica a maneira de alcançar resultados, pois os valores de entalpia, entropia e energia livre de Gibbs podem ser obtidos graficamente.

Os dados termodinâmicos obtidos mostram com clareza que o fenômeno de adsorção em estudo caracteriza-se como fisissorção, pois os valores de ΔH para todos os compostos foi menor que 50 KJ mol⁻¹, valor que a literatura dita como sendo valor de referência para fisissorção e quimissorção.

Os valores de ΔH ainda mostram a força da interação do analito com a fase estacionária. O valor de entalpia encontrada para o piperonal foi igual a -1,134 KJ mol⁻¹, mostrando que o composto com menor interação apresenta o maior valor de entalpia, ao passo que o terpinoleno, composto mais retido, apresenta o menor valor de entalpia, -6,682 KJ mol⁻¹.

Os dados obtidos nesta Dissertação ilustram que é possível a purificação do produto resultante da síntese orgânica do piperonal, pois foi possível observar a completa separação dos compostos safrol, isosafrol e terpinoleno. Os dados ainda podem, por exemplo, ajudar a aumentar a escala de produção, em uma escala preparativa ou semi preparativa, e até mesmo para cromatografia contínua.

Para trabalhos futuros com assuntos relacionados ao tema desta Dissertação, pode-se deixar como sugestões:

- a) Obter experimentalmente os valores do coeficiente de dispersão axial;
- b) E transferência de massa;
- c) Utilizar uma fase móvel diferente para assim, evitar o aumento excessivo da pressão de trabalho do sistema, como por exemplo, substituir o etanol por acetonitrila.
- d) Estudar a viabilidade da aplicação da técnica em uma escala semi preparativa ou mesmo preparativa, com fins de aumentar a produção e purificação do piperonal;
- e) Estudar uma fase móvel e estacionária que possibilite a separação do safrol e isosafrol.

6 Referências bibliográficas

ALVAREZ, H. M.; BARBOSA, D. P.; FRICKS, A. T.; ARANDA, D. A. G.; VALDÉS, R. H.; ANTUNES, O. A. C. Production of Piperonal, Vanillin, and p-Anisaldehyde via Solventless Supported Iodobenzene Diacetate Oxidation of Isosafrol, Isoeugenol, and Anethol Under Microwave Irradiation. *Organic Process Research & Development*. v. 10, p. 941-943, 2006.

ANIRUDHAN, T. S.; RADHAKRISHNAN, P. G.; Thermodynamics and kinetics of adsorption of Cu (II) from aqueous solutions onto a new cation exchanger derived from tamandarin fruit shell. *Journal of Chemical Thermodynamics*, v.40, p. 702-709, 2008.

ATKINS, P; de PAULA, J. ATKINS' PHYSICAL CHEMISTRY. 8. ed. W. H. Freeman editor, New York, 2006, 1072p.

BAKER, J. S.; VINCI, J. C.; MOORE, A. D.; COLÓN, L. A. Physical characterization and evaluation of HPLC columns packed with superficially porous particles. *Journal of Separation. Science*, v.33, p.2547-2557, 2010.

BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. A utilização do safrol, principal componente químico do óleo de sassafráz, na síntese de substâncias bioativas na cascata do ácido araquidônico: antiinflamatórios, analgésicos e anti-trombóticos. *Química Nova*, v. 22, n. 5, p. 744-759, 1999

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

BIZZO, H.R.; HOVELL, M. C.; REZENDE, C. M. Brazilian essential oils: general view, developments and perspectives. *Química Nova*. v. 3, p. 588-594, 2009.

BLANDAMER, M. J.; BRIGGS, B.; CULLIS, P. M.; IRLAM, K. D.; ENGBERTS, J. B. F. N.; KEVELAM, J. Titration microcalorimetry of adsorption processes in aqueous systems – Interaction of sodium dodecylsulfate and sodium decylsulfate with poly(*N*-vinylpyrrolidone). *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions*, v. 94, n. 2, p. 259-266, 1998.

BOULICAUT, L.; BRANDANI S.; RUTHVENN, D. M.; Liquid phase sorption and diffusion of branched and cyclic hydrocarbons in silicalite. *Microporous and Mesoporous Materials*, v. 25, n. 1-3, p. 81-93, 1998.

BRAGA, N. P., PROCESSO DE OBTENÇÃO E SEPARAÇÃO DO PIPERONAL A PARTIR DO ÓLEO ESSENCIAL DE PIMENTA-LONGA (*Piper hispidinervium* C. DC), Campinas, UNICAMP, 2007.255p. Tese de Doutorado.

BRUNAUER, S.; DEMING, L. S.; DEMING, W. E.; TELLER, E.; On a Theory of the van der Waals Adsorption of Gases. *Journal of the American Chemical Society*. v. 62, p. 1723-1732, 1940.

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

CALVETE, T.; LIMA, E.C.; CARDOSO, N.F.; VAGHETTI, J.C.P.; DIAS, S.L.P.; PAVAN, F.A.; Application of carbon adsorbents prepared from Brazilian-pine fruit shell for the removal of reactive orange 16 from aqueous solution: Kinetic, equilibrium, and thermodynamic studies. *Journal of Environmental Management*, v. 91, p. 1695-1706, 2010.

CHEN, X.; ZHOU, Z.; YUAN, H.; MENG, Z. Preparation and Chiral Recognition of a Mono[6A-N-1-(2-hydroxy)-phenylethylimino-6A-deoxy]- β -Cyclodextrin HPLC Stationary Phase. *Journal of Chromatographic Science*, v. 46, p.777-782, 2008.

CHOUDHARY, V. R.; NAYAK, V. S.; CHOUDHARY, T. V.; Single-Component Sorption/Diffusion of Cyclic Compounds from Their Bulk Liquid Phase in H-ZSM-5 Zeolite *Industrial & Engineering Chemistry Research*, v. 36, p.1812-1818, 1997.

CIOLA, R. Fundamentos da Cromatografia a Líquido de Alto Desempenho – HPLC, Editora Edgard Blücher, São Paulo, 1998. 179p.

CLAESSENS, H. A.; van STRATEN, M. A.; Review on the chemical and thermal stability of stationary phase for reversed-phase liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*. v. 1060, p. 23-41., 2004.

COLLINS, C. H. Princípios básicos de cromatografia in COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. Fundamentos de Cromatografia. Editora UNICAMP, São Paulo, 2006, 453p.

CORRÊA JÚNIOR, C.; MING, L. C.; SCHEFFER, M. C. Cultivo de plantas medicinais, condimentares e aromáticas. 2.ed., Fundação de Estudos e Pesquisas em Agronomia, Medicina Veterinária e Zootecnia, Jaboticabal, 1994. 162p.

COSTA, C. M. L. Influência das condições de secagem no rendimento e na composição do óleo essencial de pimenta longa (*Piper hispidinervum* C. DC.). Dissertação de Mestrado. DEQ/UFPa, Belém, 1999.

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.02, p.181-194, 2001.

CREMASCO, M. A.; BRAGA, N. P. Síntese do piperonal a partir do óleo essencial de pimenta longa (*Piper hispidinervum* C. DC). *Acta Amazônica*, v. 42, n. 2. p. 275-278, 2012.

CREMASCO, M. A.; BRAGA, N. P. Tecnologia de Processamento do óleo essencial de pimenta-longa (*Piper hispidinervum* C. DC.) para a produção de piperonal in XVIII Congresso Brasileiro de Engenharia Química, 2010, Foz do Iguaçu. Anais de Congresso. 2010. v.1.

CREMASCO, M. A.; Fundamentos de Transferencia de Massa. 2.ed., Editora da Unicamp, São Paulo, 2002, 742p.

D. H. JAMES; C. S. G, PHILIPS. The chromatography of gases and vapours. Part III. The determination of adsorption isotherms. *Journal of the Chemical Society*, p. 1066-1070, 1954.

DAVIES, R. R.; HODGSON, H. H. The preparation of aldehydes by the disruptive oxidation of the ethylene linkage *Journal of Society of Chemistry Industry*, v. 62, n.6, p. 90-92, 1943.

DE JONG, A. W. J.; KRAAK, J. C.; POPPE, H.; NOOITGEDACHT, F. Isotherm linearity and sample capacity in liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, v. 193, n. 2, p. 181-195, 1980.

DIAS, R. M. Separação cromatográfica quiral do O,P'-diclorodifenildicloroetano (mitotano) em fase estacionária quiral O,O' Bis [4-*terc*-butilbenzoil]-N,N'-Dialil-L-Tartardiamida. Campinas: Universidade Estadual de Campinas, 2007. 152p. Dissertação de Mestrado.

DITZ, R. Introduction in SCHMIDT-TRAUB, H. Preparative Chromatography of Fine Chemicals and Pharmaceutical Agents. Editora Wiley-VCH, Weinheim, 2005, 458p.

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.

FARINACCI, N. T. OXIDATION OF ORGANIC COMPOUNDS WITH A CHROMIC OXIDIZING AGENT. United States Patent, n. 2,794,813, New York, USA, 1957.

FREITAS, A. F. Caracterização e aplicação da fase estacionária quiral tris (3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose na separação preparativa dos enantiômeros do omeprazol. Campinas: Universidade Estadual de Campinas, 2009. 138p. Tese de Doutorado.

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

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

GILES, C. H.; SMITH, D.; HUITSON, A. A General Treatment and Classification of the Solute Adsorption Isotherm – I. Theoretical. *Journal of Colloid and Interface Science*, v.47, n.3, p.755-765, 1974.

GLUECKAUF, E. Theory of Chromatography. Part II Chromatograms of a Single Solute. *Journal of Chemical Society*, n. 0, p. 1302-1308, 1947.

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*, v. 59, p. 305-313, 2004.

GÖTMAR, G.; SAMUELSSON, J.; KARLSSON, A.; FORNSTEDT, T. Thermodynamic characterization of the adsorption of selected chiral compounds on immobilized amyloglucosidase in liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, v. 1156, p. 3-13, 2007.

GREGG, J. S.; SING, S. K. Adsorption, Surface Area and Porosity. 2.ed. Editora Academic Press, New York, 1982, 303p.

GRIMSHAW, J.; HUA, C. The conversion of isosafrole to piperonal and anethole to anisadehyde: electrochemical active manganese dioxide. *Electrochimica Acta*, v. 39, n. 4, p. 497-499, 1994.

GRITTI, F.; GOTMAR, G.; STANLEY, B.; GUIOCHON, G. Determination of single component isotherm and affinity energy distribution by chromatography. *Journal of Chromatography A*, v. 988, p.185-203, 2003.

GUIOCHON, G. Preparative liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, v. 965, p. 129-161, 2002.

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, Academic Press, Boston, 1994, 701p.

GUIOCHON, G.; TRAPP, O. Basic Principles of Chromatography *in* Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, Wiley-VCH, 2012.

HE, H.; LIU, Y.; WANG, X.; PAHM-HUY, C. Effect of Temperature on Enantiomer Separation of Oxzepam and Lorazepam by High-Performance Liquid Chromatography on a β -Cyclodextrin Derivatized Bonded Chiral Stationary Phase. *Journal of Chromatographic Science*, v. 42, p. 62-66, 2004.

HEYNES, H. W. JR., The Determination of Effective Diffusivity by Gas Chromatography. Time Domain Solution. *Chemical Engineering Science*, v.30, p.955-961, 1975.

HOTTEL, H. C.; SAROFIM, A. F.; WANKAT, P. C.; KNAEBEL, K. S. Heat and Mass Transfer *in* PERRY, ROBERT H. Perry's chemical engineers' handbook. 7.ed. United States of America: McGraw-Hill, 1997.

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

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

JANDERA, P.; KUČEROVÁ, Z.; URBAN, J. Retention times and bandwidths in reversed-phase gradient liquid chromatography of peptides and proteins. *Journal of Chromatography A*, v. 1218, p. 8874-8889, 2011.

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

JARDIM, I. M. Reparação de feridas cutâneas de camungongos tratadas com óleo de pimenta longa, *Piper hispidinervum* C.DC. Revista da Universidade do Vale do Rio Verde, v. 9, n. 1, 2011. Disponível em < <http://dx.doi.org/10.5892/RUVRV.91.258276> > Acessado: 01/10/2012.

KABIR, H.; GREVILLOT, G.; TONDEUR, D. Equilibria and activity coefficients for nonideal adsorbed mixtures from perturbation chromatography. *Chemical Engineering Science*, v. 53, n. 9, p. 1639-1654, 1998.

KACZMARSKI, K., GUBERNAK, M., ZHOU, D., GUIOCHON, G. Application of the general rate model with the Maxwell-Stefan equations for the prediction of the band profiles of the 1-indanol enantiomers. *Chemical Engineering Science*, v.58, p. 2325-2338, 2003.

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

KATTI, A. M., GUIOCHON, G. in GIDDINGS, J. C., GRUSHKA, E., BROWN, P. R. "Advances in Chromatography", v. 31, Marcel Dekker, Inc., New York, USA, 1991.

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

LANÇAS, F. M.; cromatografia líquida moderna: HPLC | CLAE., Editora Átomo, São Paulo, 2009, 382p.

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

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

LISEC, O., HUGO, P. SEIDEL-MORGENSTERN, A. Frontal analysis method to determine competitive adsorption isotherms. *Journal of Chromatography A*, v.908, p. 19-34, 2001.

LOUN, B.; HAGE, D. S.; Chiral Separation Mechanism in Protein-Based HPLC Columns. 1. Thermodynamic Studies of (R)- and (S)-Warfin Binding to Immobilized Human Serum Albumin. *Analytical Chemistry*, v.66, p. 3814-3822, 1994.

MA, Z.; R.D WHITLEY E L. N.-H. WANG, Pore and Surface Diffusion in Multicomponent Adsorption and Liquid Chromatography Systems. *AIChE Journal*, v.42, n.5, p.1244-1262. 1996.

MARCHETTI, N.; CAVAZZINI, A.; PASTI, L.; DONDI, F.; Determination of adsorption isotherms by means of HPLC: Adsorption mechanism elucidation and separation optimization. *Journal of Separation Science*. v. 32, p. 727-741, 2009.

MAZZOTTI, M.; STORTI, G.; MORBIDELLI, M. Optimal operation of simulated moving bed units for nonlinear chromatographic separations. *Journal of Chromatography A*. v. 769, n. 1,2, p. 3-24, 1997.

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

MICHEL, M., EPPING, A., JUPKE, A. Modeling and Determination of Model Parameters in SCHMIDT-TRAUB, H. Preparative Chromatography of Fine Chemicals and Pharmaceutical Agents. Editora Wiley-VCH, Weinheim, 2005, 458p.

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

MIYABE, K. Surface Diffusion in C18-Silica Monolithic Stationary Phase. *Journal of Chromatographic Science*, v. 47, p.452-458. 2009.

MIYABE, K.; GUIOCHON, G. A Kinetic Study of Mass Transfer in Reversed-Phase Liquid Chromatography on a C18-Silica Gel. *Analytical Chemistry*, v.72, p.5162-5171, 2000.

MIYABE, K.; GUIOCHON, G. Comparison of the Characteristics of Adsorption Equilibrium and Surface Diffusion in Liquid – Solid and Gas – Solid Adsorption on C₁₈-Silica Gel. *The Journal Physical Chemistry B*, v.108, p.2987-2997, 2004.

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

NASCIMENTO, A. C. Resolução enantiomérica do Secnidazol. Campinas: Universidade Estadual de Campinas, 2012, 122p, Dissertação de Mestrado.

NASCIMENTO, A. C.; PERNA, R. F.; CREMASCO, M. A.; SANTANA, C. C. Enantioseparation of Secnidazole by High-Performance Liquid Chromatography using Amylose-based Stationary Phase. *Adsorption Science & Technology*, v. 30, n. 8-9, p. 739-750, 2012.

NASSAR, M. M.; MAGDY, Y. H.; Removal of Different Basic Dyes from Aqueous Solutions by Adsorption on Palm-Fruit Bunch Particles. *Chemical Engineering Journal*, v.66, p.223-226, 1997.

NAWROCKI, J. The silanol group and its role in liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, v. 779, n. 1-2, p. 29-71, 1997.

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

PEOCK, S.; MAUNDER, J, W. Arena Tests with Piperonal, A New Louse Repellent. *Journal of the Royal Society for Health*, v. 113, n. 6, p. 292-294, 1993.

PESEK, J. J.; MATYSKA, M. T. Hydride-based silica stationary phase for HPLC: Fundamental properties and applications. *Journal of Separation Science*, v. 48, p. 1845-1854, 2005.

PÉTER, A.; TÖRÖK, G.; FÜLÖP, F. Effect of Temperature on Retention of Cyclic β -Amino Acid Enantiomers on a Chiral Crown Ether Stationary Phase. *Journal of Chromatographic Science*, v. 36, p. 311-317, 1998.

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

POLING, B. E.; PRAUSNITZ, J. M.; O'Connell, J. P. The Properties of Gases and Liquids. 5. ed. McGraw-Hill, 2004. 707p.

RAMESH, A.; LEE, D, J.; WONG, J. W. C. Thermodynamics parameters for adsorption equilibrium of heavy metals and dyes from wastewater with low-cost adsorbents. *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 291, p. 588-592, 2005.

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.

ROJKOVIČOVÁ, T.; LEHOTAY, J.; KRUPČÍK, J.; FEDURCOVÁ, A.; ČIŽMÁRIK, J.; ARMSTRONG, D. W. Study of the Mechanism of Enantioseparation. VII. Effect of Temperature on Retention of Some Enantiomers of Phenylcarbamic Acid Derivates on a Teicoplanin Aglycone Chiral Stationary Phase. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*, v. 27, n. 11, p. 1653-1671, 2004.

ROSA, P. C.P.; Estudo da separação cromatográfica dos enantiômeros do omeprazol em fase estacionária quiral Kromasil CHI-TBB (O,O'-bis[4-ter-butilbenzoil]-N,N'-dialil-L-tartardiamida).Campinas: Universidade Estadual de Campinas, 2005, 140p. Dissertação de mestrado.

ROUQUEROL, F.; ROUQUEROL, J.; SING, K.; Adsorption by Porous Solids – Principles, Methodology and Applications, Elsevier, 1999.

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

RUTHVEN, D.M. Sorption Equilibrium in Microporous Solids *in* KARGE, H.G; WEITKAMP, J. Molecular Sieves 7 Science and Technology – Adsorption and Diffusion, Springer, 2008. 411p.

RUTHVEN, D.M; CHING, C. -B. Counter-current and simulated counter-current adsorption separation process. *Chemical Engineering Science*, v.44, n.05, p. 1011-1038, 1989.

SAHA, P.; CHOWDHURY, S.; Insight Into Adsorption Thermodynamics *in* TADASHI, M, Thermodynamics, InTech, 2011. 440p.

SANTOS, A. S.; PEREIRA JR, N.; DA SILVA, I. M.; SARQUIS, M. I. M.; ANTUNES, O. A. C. Peroxidase catalyzed microbiological oxidation of isosafrol into piperonal. *Process Biochemistry*, v. 39, p. 2269-2275, 2004.

SAUTER, I. S.; ROSSA, G. E.; LUCAS, A. M.; CIBULSKI, S. P.; ROEHE, P. M.; SILVA, L. A. A.; ROTT, M. B.; VARGAS, R. M. F.; CASSEL, E.; POSER, G. L. Chemical composition and

amoebicidal activity of *Piper hispidinervum* (Piperaceae) essential oil. *Industrial Crops and Products*. v. 40, p. 292-295, 2012.

SCHAY, G.; SZÉKELY, G. adsorption measurements in flow systems. *Acta Chimica (Academie Scientiarum) Hungaricae*, v. 5, p.167-182, 1954.

SCHLAUCH, M.; FRAHM, A. W. A Thermodynamic Study of the Temperature-Dependent Elution Order of Cyclic α -Amino Acid Enantiomers on a Copper (II) – D-Penicillamine Chiral Stationary Phase. *Analytical Chemistry*. v. 73, p.262-268, 2001.

SCHMIDT-TRAUB, H. Preparative Chromatography of Fine Chemicals and Pharmaceutical Agents. Editora Wiley-VCH, Weinheim, 2005, 458p.

SCHNEIDER, P., SMITH, M. J., Adsorption Rate Constants from Chromatography. *AIChE Journal*, v.14, n.5, p.762-771, 1968.

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.; EPPING, A. Fundamentals and General Terminology in SCHMIDT-TRAUB, H. Preparative Chromatography of Fine Chemicals and Pharmaceutical Agents. Editora Wiley-VCH, Weinheim, 2005, 458p.

SCHLÜTER, H. Reversed-Phase Chromatography. *Journal of Chromatography Library*, v. 61, p. 147-263, 1999.

SCHWANKE, O. R. Determinação da difusividade de hidrocarbonetos aromáticos em zeólitas Y por métodos cromatográficos, Florianópolis: UFSC, 2003; 95p. Dissertação de Mestrado.

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.; GUIOCHON, G.; Thermodynamics of the adsorption of Tröger's base enantiomers from ethanol on cellulose triacetate. *Journal of Chromatography*, v. 631, p. 37-47, 1993.

SIDDIQUI, M.A.; LUCAS, K. Correlations for Prediction of Diffusion in Liquids. *The Canadian Journal of Chemical Engineering*, v.64, p.839-843, 1986.

SILVA JR, I. J. Estudo cinético e de equilíbrio na separação cromatográfica dos enantiômeros da cetamina em triacetato de celulose microcristalina. Campinas: Universidade Estadual de Campinas, 2003. 104p. Dissertação de Mestrado.

SILVA JR, I. J. Separação Cromatográfica dos Enantiômeros do Anestésico Bupivacaína e Projeto de Condições de Operação em Leito Móvel Simulado. Campinas: Universidade Estadual de Campinas, 2006. 189p. Tese de Doutorado;

SNYDER, L. R., KIRKLAND, J. J. Introduction to modern liquid chromatography New York, John Wiley & Sons, 2nd edition.1979;

SNYDER, L. R. HPLC: Past and Present. *Analytical Chemistry*, v.72, n.11, p.412A-420A, 2000;

STARQUIT, AXEL, N. V. R. D. Método alternativo para a resolução numérica de modelo dinâmico para Leito Móvel Simulado em condições de isotermas lineares, Campinas: UNICAMP, 2004; 158p. Dissertação de Mestrado;

STERN, E.; GOOSSENS, L.; VACCHER, C.; BONTE, J. -P.; DEPREUX, P.; HENICHART, J. -P.; GOOSSENS, J. -F. Chiral resolution of the enantiomers of new selective CB₂ receptor agonists by liquid chromatography on amylose stationary phases. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 46, n. 5, p. 848-853, 2008;

STRAND, G. Activated carbon for purification of alcohol – and some useful distillation tips. Ebook. Disponível em <<http://homedistillation.com>> Acessado: 19/09/2011;

SUN, M. S.; TALU, O.; SHAH, D. B.; Adsorption Equilibria of C5 – C10 Normal Alkanes in Silicalite Crystals *The Journal of Physical Chemistry*, v.100, p.17276-17280, 1996;

SUZUKI, M. Adsorption Engineering. Editora Kodansha-Elsevier, Tokyo, 1990, 179p.

TORII, S.; UNEYAMA, K.; UEDA, K. An electrochemical procedure for a practical preparation of piperonal from isosafrole. *Journal of Organic Chemistry*, v.49, n.10, p.1830-1832, 1984;

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

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

UNGER, K. K.; HOHENESCHE, C. D. F. V.; SCHULTE, M. Columns, Packings and Stationary Phases *in* SCHMIDT-TRAUB, H. Preparative Chromatography of Fine Chemicals and Pharmaceutical Agents. Editora Wiley-VCH, Weinheim, 2005, 458p;

URBAN, J.; JANDERA, P.; KUČEROVÁ, Z.; VAN STRATEN, M. A.; CLAESSENS, H. A. A Study of the effects of column porosity on gradient separations of proteins. *Journal of Chromatography A*, v.1167, p. 63-75, 2007;

VAN WELL, W. J. M.; JÄNCHEN, J.; DE HAAN, J. W.; VAN SANTEN, R. A.; Adsorption of Linear Alkanes in the α -Cages and γ -Cages of H-ZK-5 and K-ZK-5. *The Journal of Physical Chemistry*, v.103, p.1841-1853, 1999;

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, p. 2567-2586, 2002;

WENG, W.; WANG, Q. H.; YAO, B. X.; ZENG, Q. L. Enantioseparation of amino acid derivatives on an immobilized network polymer derived from *L*-tartaric acid. *Journal of Chromatography A*, v. 1042, n. 1-2, p. 81-87, 2005;

WEWERS, W.; DINGENEN, J.; SCHULTE, M.; KINKEL, J. Selection of Chromatographic Systems *in* SCHMIDT-TRAUB, H. Preparative Chromatography of Fine Chemicals and Pharmaceutical Agents. Editora Wiley-VCH, Weinheim, 2005, 458p;

WILSON, E.J.; GEANKOPLIS, C.J. Liquid Mass Transfer at Very Low Reynolds Number. *Industrial Engineering and Chemistry Fundamentals*. v.5, n.1, p.9-14, 1966;

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;

Apêndice A

Análise frontal e isothermas de adsorção para fase móvel 100% etanol.

Análise frontal na determinação de isothermas com fase móvel 100% etanol

O método da análise frontal é um dos mais utilizados para se determinar isothermas de adsorção, devido a sua relativa facilidade na aplicação e alta precisão (MIHLBACHLER, 2002). Esse método foi aplicado no presente estudo. O método consiste em, alimentar a coluna com uma solução contendo o analito em estudo, até a mesma atingir o equilíbrio, após isso a coluna é regenerada com a fase móvel. Esse procedimento é realizado para várias concentrações, nesse trabalho o número de pontos para a isoterma foi fixado em 5, devido a pequena faixa de concentração de trabalho e a restrição para concentrações elevadas em colunas analíticas, ainda, Miyabe (2009) realizou um experimento correlato com 4 pontos e Urban (2007) com 6 pontos.

A primeira saturação de coluna é feita com a concentração mais baixa e a última com a solução de maior concentração. As condições experimentais para a determinação das curvas de ruptura para posterior obtenção das isothermas, e consequentemente, constantes modificadas de Henry foram: temperatura 25 °C, fase móvel 100% etanol e vazão 1 mL min⁻¹.

Foram obtidas as isothermas para a fase móvel 70/30 (v/v) etanol e água, também. Expostas no Capítulo 4. Com isso pode-se observar o efeito da adição de água à fase móvel, e a resposta obtida em termos de constantes modificadas de Henry.

As figuras (A.1), (A.2), (A.3) e (A.4) representam as curvas de ruptura obtidas para cada composto, temperatura e concentração, por meio dos dados de equilíbrio obtidos das curvas é possível obter as isothermas de adsorção.

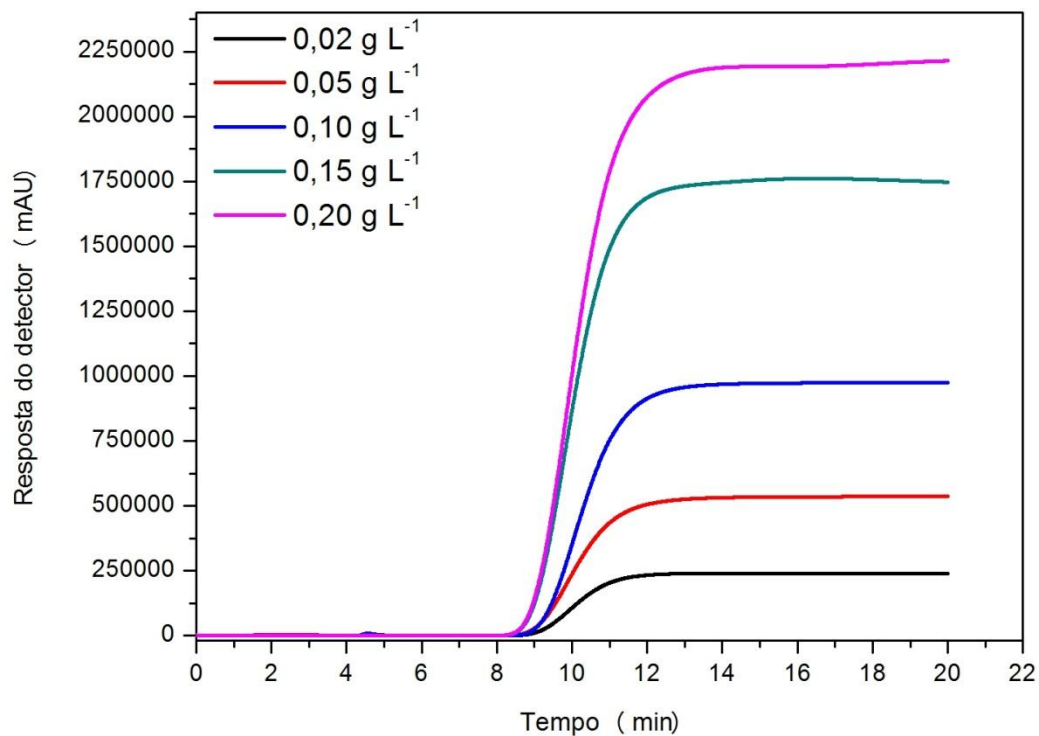


Figura A.1 – Curva de ruptura para o piperonal à 25 °C.

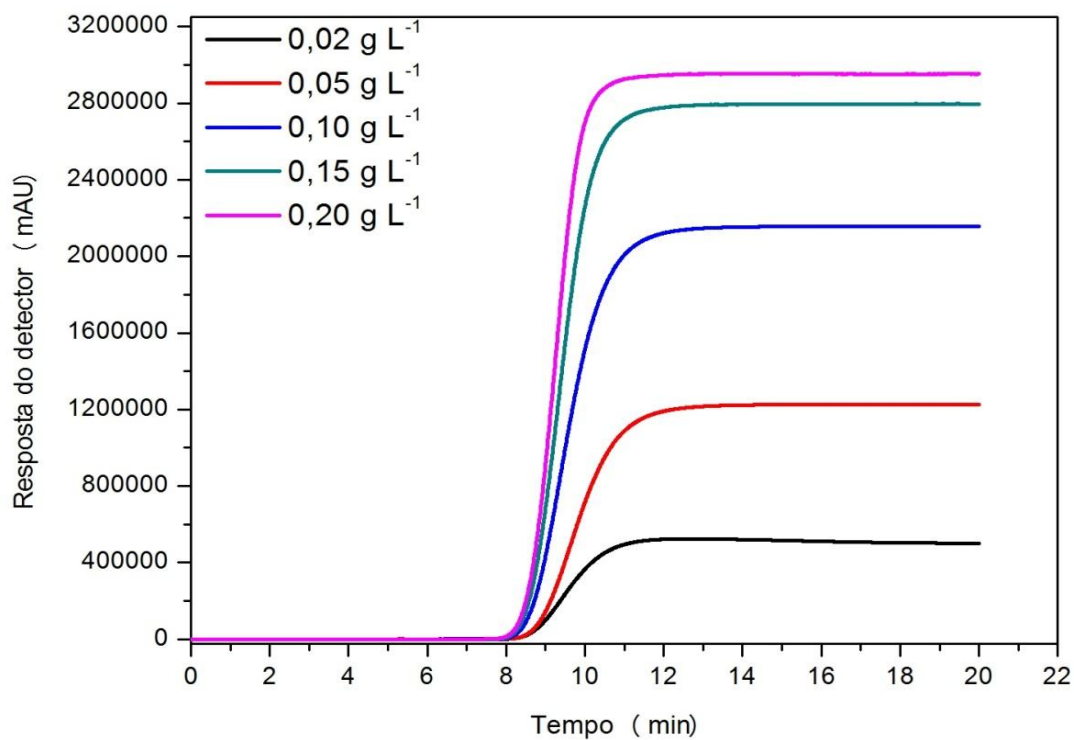


Figura A.2 – Curva de ruptura para o safrol à 25 °C.

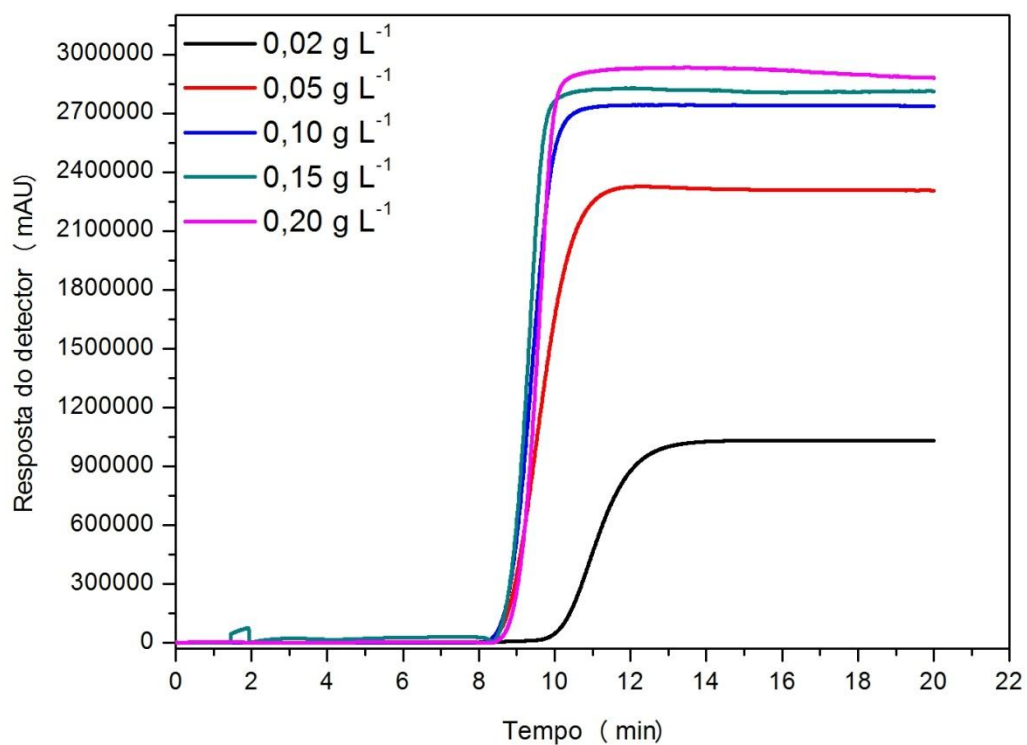


Figura A.3 – Curva de ruptura para o isosafrol à 25 °C.

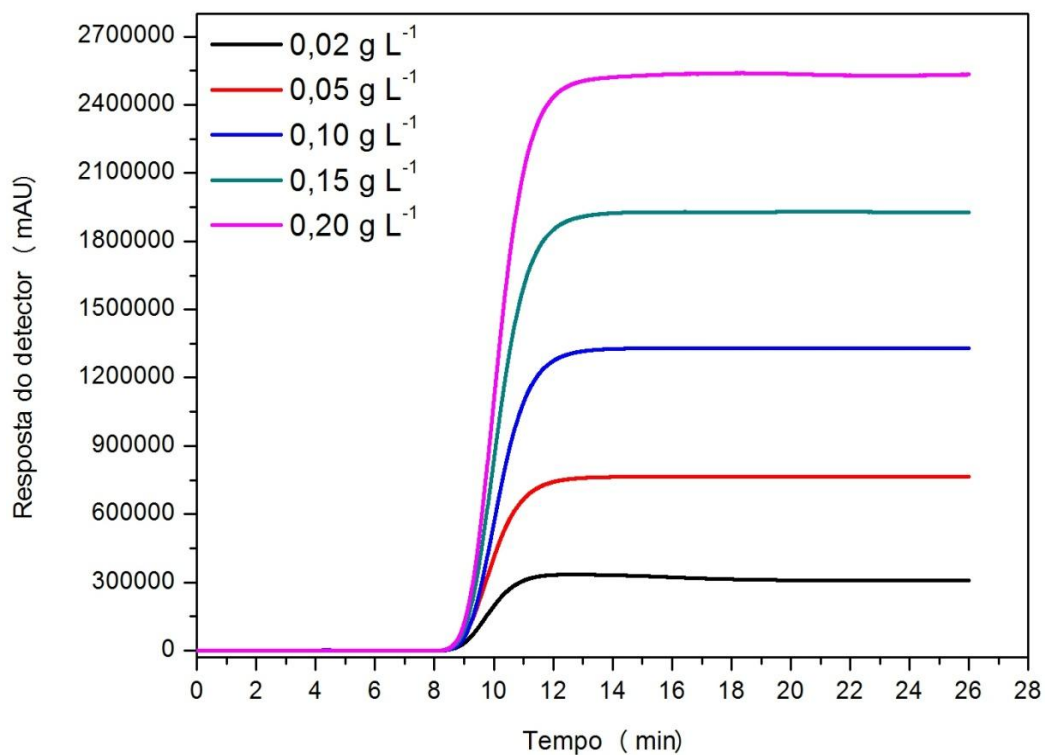


Figura A.4 – Curva de ruptura para o terpinoleno à 25 °C.

Aplicando a derivada primeira nos dados representados nas Figuras (A.1) a (A.4) é possível obter os valores do ponto de inflexão para cada curva; ponto esse que será aplicado na Equação (2.17), para obter o valor da concentração de equilíbrio na fase estacionária.

O tempo de retenção no ponto de inflexão é análogo ao volume de inflexão, sendo este diretamente obtido do resultado da derivada, quando a curva de ruptura é obtida a uma vazão de 1 mL min⁻¹. O volume morto (V_M) do sistema é obtido subtraindo o tempo de retenção da planta (t_0) do tempo de retenção do poliestireno, ambos na vazão estudada. O volume de adsorvente na coluna (V_a) é obtido por meio da Equação (2.18).

Isotermas de adsorção para fase móvel 100% etanol

Uma vez que todos os dados de equilíbrio termodinâmico foram obtidos, por meio da AF, é possível traçar as isotermas de adsorção para os componentes.

A Figura (A.5) mostra que a isoterma linear se ajusta com uma boa precisão aos dados obtidos. Em assim sendo, pode se determinar a constante modificada de Henry (K_p) para os compostos por meio da inclinação da reta. A forma linear das isotermas é dada pela Equação (2.16).

$$q = k_p c \quad (2.16)$$

Schulte e Epping (2005) relatam que a importância da região linear nas isotermas não é restrita à cromatografia analítica, mas também a cromatografia preparativa, pois dessa região advém a constante modificada de Henry. Quanto maior a constante modificada de Henry para um composto maior será a adsorção e, conseqüentemente, maior o tempo de retenção do composto na coluna. Para haver a separação entre dois compostos as constantes, K_p , tem de ser diferentes. As Equações (2.24)

$$\alpha = \frac{k_i}{k_j} = \frac{t_{R,i} - t_0}{t_{R,j} - t_0} \quad (2.24)$$

A Figura (A.5) ainda mostra que a separação dos componentes é muito complicada para a temperatura e fase móvel estudadas, devido à proximidade entre as constantes modificadas de Henry.

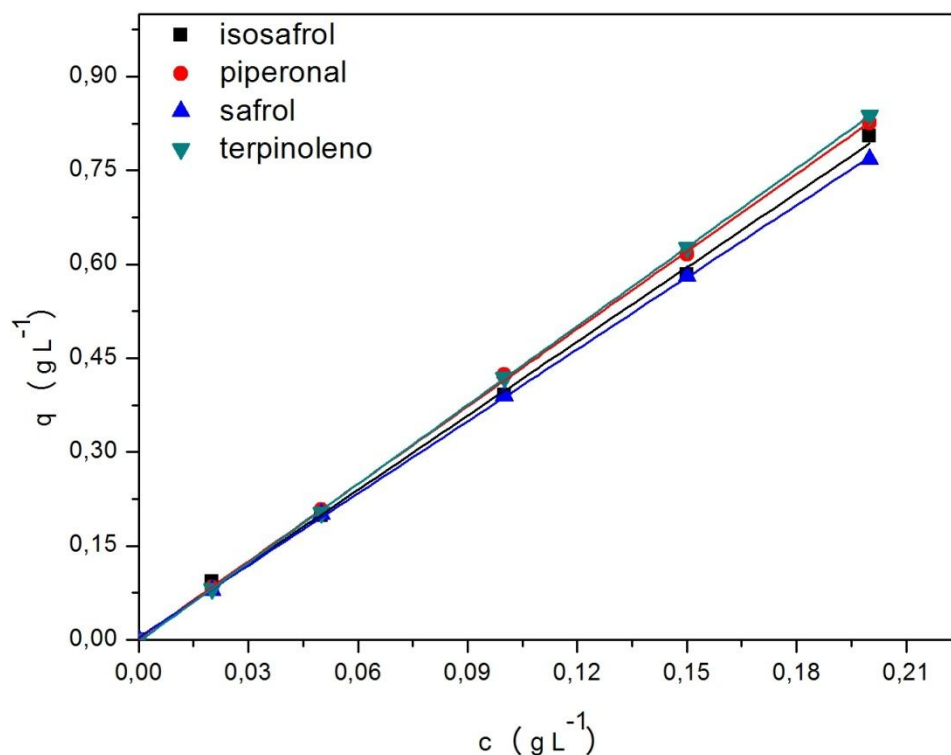


Figura A.5 – Isotermas de adsorção para o piperonal, safrol, isosafrol e terpinoleno.

A Tabela (A.1) agrupa os valores das constantes modificadas de Henry obtidas para cada isoterma, bem como o coeficiente de determinação da isoterma linear, em comparação aos dados obtidos experimentalmente. Ainda podem ser observados na Tabela (A.1) os valores da seletividade, usando sempre o piperonal como composto referencia.

A seletividade foi obtida por meio da Equação (2.25), que relaciona a razão entre duas constantes de Henry. Conclui-se, pelos valores expostos, que a separação do piperonal, nas condições: fase móvel etanol, fase estacionária sílica gel C₁₈ e temperatura igual a 25 °C. De acordo com Schmidt-Traub (2005), o valor aceitável de seletividade para a separação entre dois compostos é de 1,2.

Tabela A.1 – Constantes modificadas de Henry para o piperonal, safrol, isosafrol e terpinoleno em fase móvel 100% etanol.

Composto	Constante modificada de Henry	Coeficiente de determinação	Seletividade (α)
Piperonal	3,98	0,9996	-
Safrol	4,00	0,9993	1,005
Isosafrol	4,12	0,9957	1,035
Terpinoleno	4,72	0,9940	1,185

Apêndice B

Curvas de calibração para o piperonal, safrol, isosafrol e terpinoleno.

Curva de calibração para os compostos

As curvas de calibração para os compostos estudados foram obtidas mediante as injeções de 20 μL de solução contendo o analito em etanol. As condições experimentais definidas para os experimentos foram: concentrações 0,02; 0,05; 0,1; 0,15 e 0,2 g L^{-1} ; detector Uv-Vis foi ajustado para 230 nm, para os compostos safrol, isosafrol e terpinoleno. O piperonal teve sua detecção feita em 245 nm; A vazão adotada foi 1 mL min^{-1} , temperatura 25 $^{\circ}\text{C}$ e fase móvel 70/30 (v/v) etanol e água.

Após as injeções dos padrões de cada composto, nas concentrações citadas, foi traçado um gráfico de concentração *versus* a área do pico de resposta ao pulso cromatográfico, para cada composto. Desta maneira, é possível obter a concentração de uma dada amostra coletada.

A Figura (B.1) representa a curva de calibração para o piperonal. As Figuras (B.2), (B.3) e (B.4) expõem as curvas de calibração para o safrol, isosafrol e terpinoleno, respectivamente.

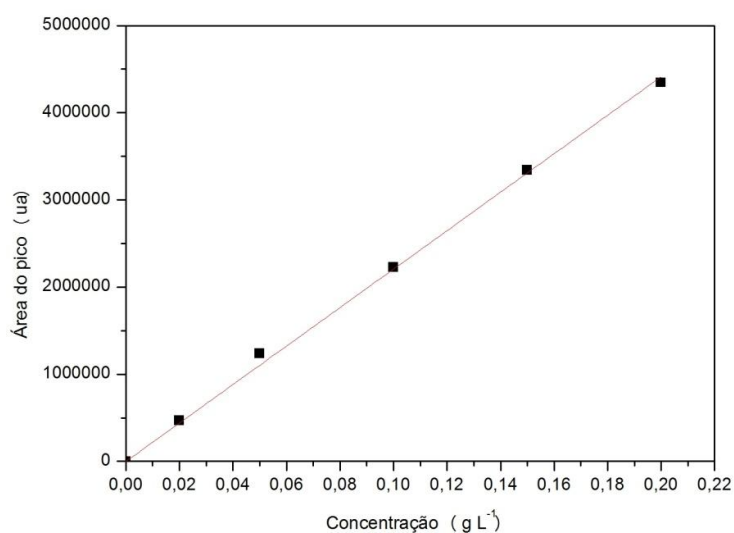


Figura B.1 – Curva de calibração para o piperonal.

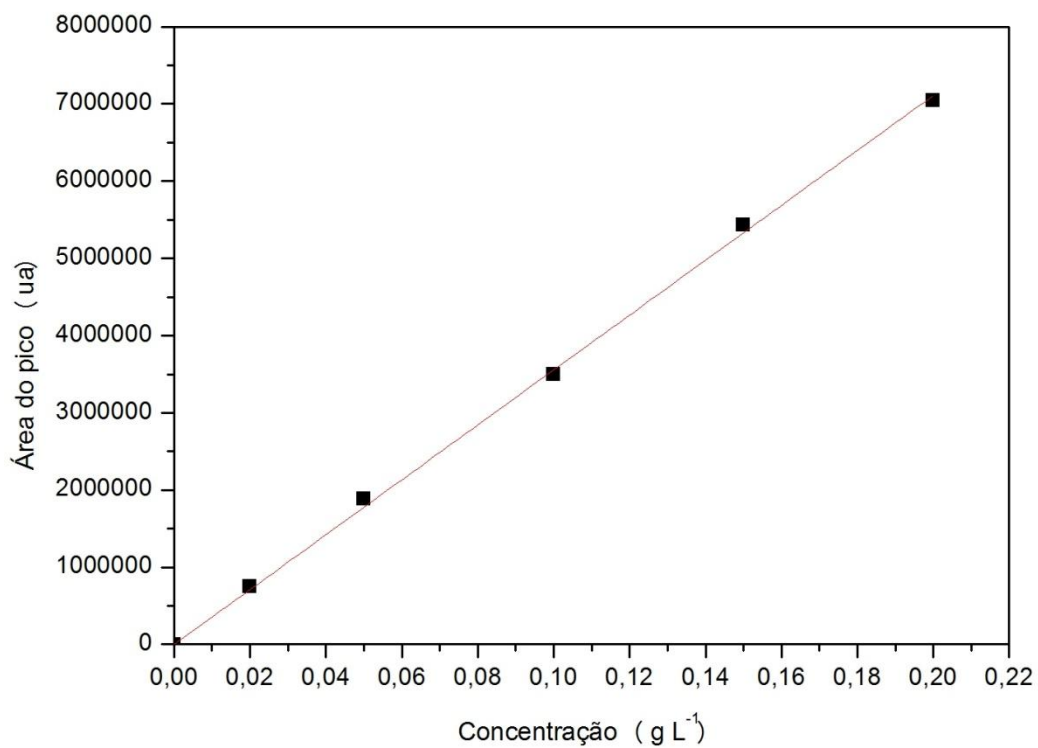


Figura B.2 – Curva de calibração para o safrol.

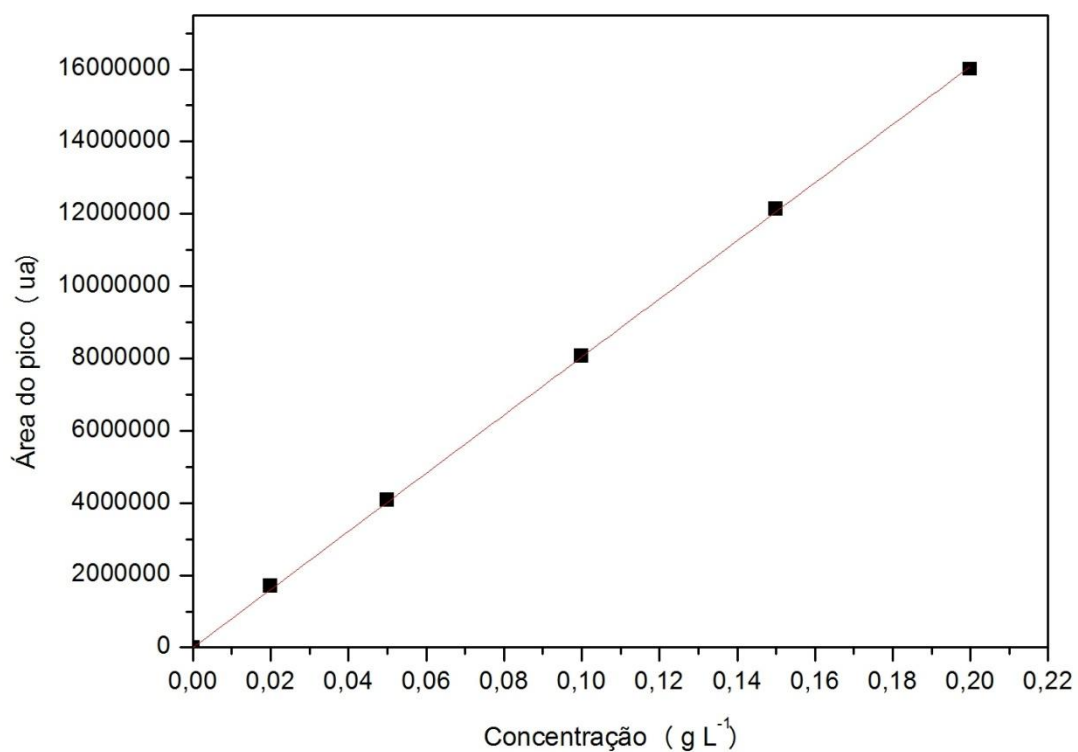


Figura B.3 – Curva de calibração para o isosafrol.

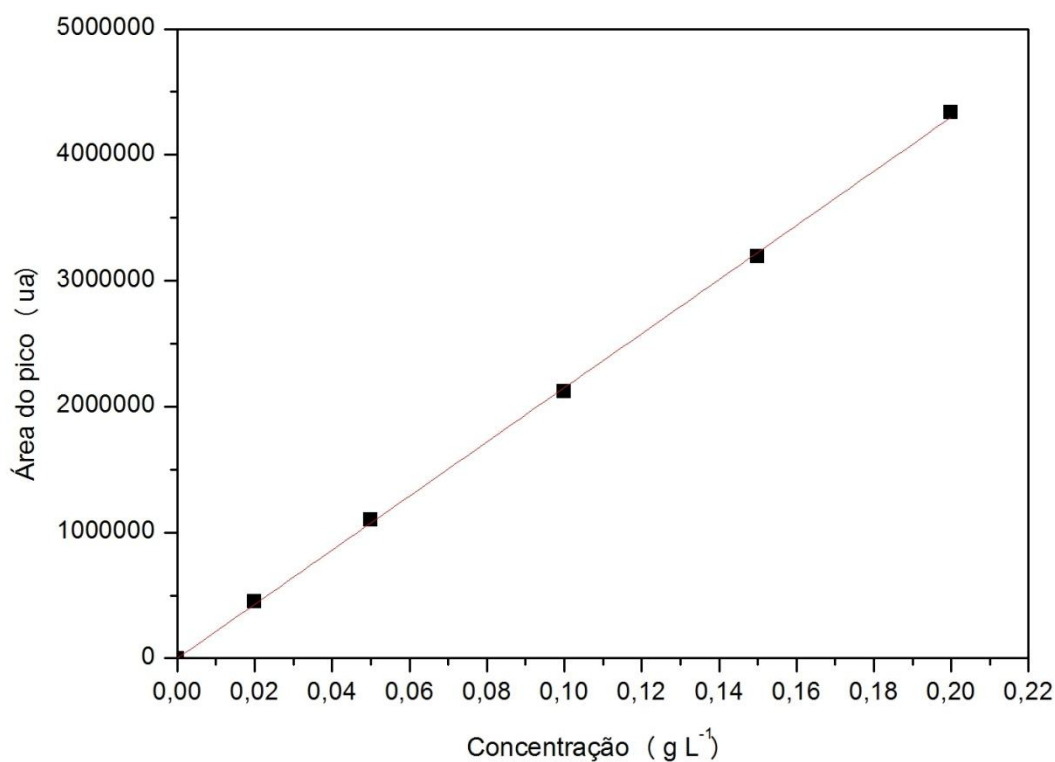


Figura B.4 – Curva de calibração para o terpinoleno.

A Tabela (B.1) fornece os valores dos coeficientes angulares, obtidos das Figuras (B.1), (B.2), (B.3) e (B.4), e também os coeficientes de determinação. O valor do coeficiente angular é utilizado para a determinação das concentrações.

Tabela B.1 – Coeficientes angulares e de determinação das curvas de calibração para os produtos da síntese do piperonal.

Composto	Coeficiente angular	Coeficiente de determinação
Piperonal	$2,207 \times 10^7$	0,9991
Safrol	$3,555 \times 10^7$	0,9996
Isosafrol	$2,150 \times 10^7$	0,9998
Terpinoleno	$8,042 \times 10^7$	0,9999