

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

**CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO DA FASE ESTACIONÁRIA QUIRAL
TRIS(3,5-DIMETILFENILCARBAMATO) DE AMILOSE NA SEPARAÇÃO
PREPARATIVA DOS ENANTIÔMEROS DO OMEPRAZOL**

Autora: Alessandra Ferraiolo de Freitas

Orientador: Prof. Dr. Cesar Costapinto Santana

Co-orientadora: Profa. Dra. Quezia Bezerra Cass

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Engenharia Química como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Doutor em Engenharia Química.

Campinas - São Paulo

Julho – 2009

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

F884c Freitas, Alessandra Ferraiolo de
Caracterização e aplicação da fase estacionária quiral tris(3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose na separação preparativa dos enantiômeros do omeprazol / Alessandra Ferraiolo de Freitas. --Campinas, SP: [s.n.], 2009.

Orientadores: Cesar Costapinto Santana, Quezia Bezerra Cass.

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

1. Quiralidade. 2. Omeprazol. 3. Omeprazol - Separação. 4. Cromatografia líquida de alta eficiência. I. Santana, Cesar Costapinto. II. Cass, Quezia Bezerra. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Química. IV. Título.

Título em Inglês: Characterization and application of the amylose tris(3,5-dimethylphenylcarbamate) chiral stationary phase in omeprazole enantiomer preparative separation

Palavras-chave em Inglês: Chirality, Omeprazole, Separation - Omeprazole, High performance liquid chromatography

Área de concentração: Desenvolvimento de Processos Biotecnológicos

Titulação: Doutor em Engenharia Química

Banca examinadora: Amaro Gomes Barreto Júnior, Gerson Luiz Vieira Coelho, Paulo de Tarso Vieira e Rosa, Regina Vincenzi Oliveira

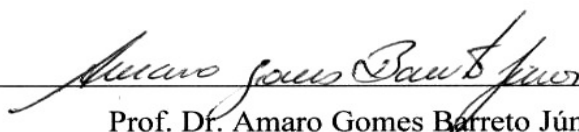
Data da defesa: 31/07/2009

Programa de Pós Graduação: Engenharia Química

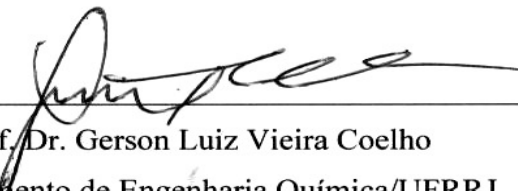
Tese de Doutorado defendida por Alessandra Ferraiolo de Freitas e aprovada em 31 de julho de 2009 pela banca examinadora constituída pelos doutores:




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



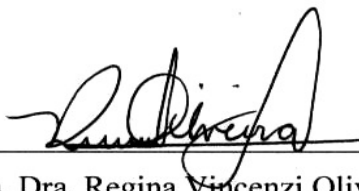
Prof. Dr. Amaro Gomes Barreto Júnior
Escola de Química/UFRRJ



Prof. Dr. Gerson Luiz Vieira Coelho
Departamento de Engenharia Química/UFRRJ

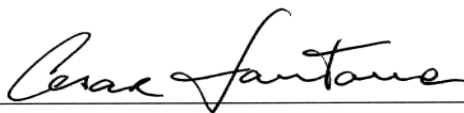


Prof. Dr. Paulo de Tarso Vieira e Rosa
Instituto de Química/UNICAMP



Profa. Dra. Regina Vincenzi Oliveira
Departamento de Química/UFSCar

Este exemplar corresponde à versão final da Tese de Doutorado em Engenharia Química defendida por Alessandra Ferraiolo de Freitas e aprovada pela comissão julgadora em 31 de julho de 2009.

A handwritten signature in black ink, reading "Cesar Costapinto Santana", is positioned above a horizontal line. The signature is written in a cursive, flowing style.

Orientador – Prof. Dr. Cesar Costapinto Santana

*Dedico este trabalho ao meu noivo **Felipe** pelo amor, compreensão,
estímulo contínuo e por jamais me deixar desistir.*

AGRADECIMENTOS

À minha irmã Adriana pelo apoio, carinho e por sempre estar ao meu lado.

Ao professor Cesar pela oportunidade de realização deste trabalho.

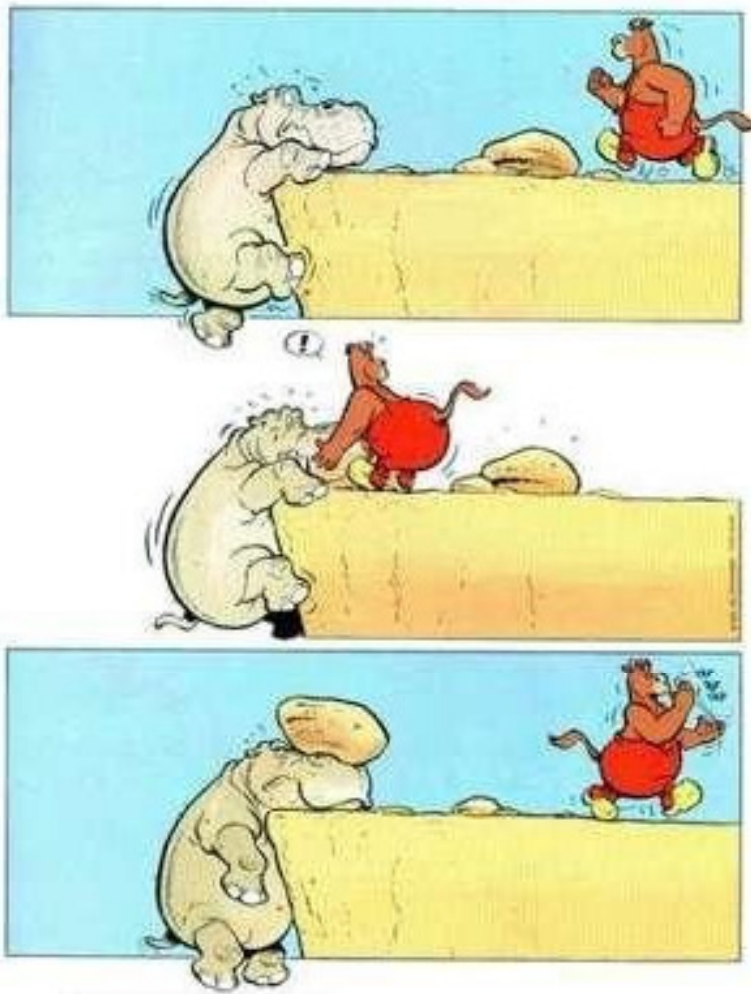
À professora Quezia do Departamento de Química/UFSCar e aos professores do Departamento de Processos Biotecnológicos/Unicamp, Dra. Ângela Maria Moraes, Dr. Everson Alves Miranda e Dra. Sônia Maria Alves Bueno, pela disponibilização e utilização dos equipamentos e dependências de seus laboratórios.

Ao professor Paulo do Instituto de Química/Unicamp pelas sugestões nos exames de qualificação e que contibuíram para o enriquecimento desta tese.

Às pessoas fundamentais no desenvolvimento deste trabalho: Amaro, João, João Paulo, Luisa, Raquel e Roberta. Muito obrigada.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo suporte financeiro.

*Um amigo, mesmo que não seja capaz de te levantar...
... arranjará uma forma de não te deixar cair.*



Aos amigos que fiz nesse período e que sempre serão lembrados.

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi a síntese, em larga escala, da fase estacionária quiral tris(3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose e posterior investigação desta na separação preparativa dos enantiômeros do omeprazol por cromatografia líquida de alta eficiência. O carbamato de amilose, caracterizado por análise elementar e espectroscopia na região do infravermelho, apresentou valores experimentais de CHN próximos aos valores teóricos e absorções no infravermelho próximas a 1720 cm^{-1} , referente ao grupo C=O, a 1220 cm^{-1} , referente à ligação C-N e em 3294 cm^{-1} , referente à ligação N-H. Experimentos de pulsos com soluções do traçador e da mistura racêmica, em diferentes temperaturas e vazões da fase móvel, foram realizados para avaliar a homogeneidade das colunas e sua influência no processo de separação, os coeficientes de dispersão axial e de transferência de massa e o comportamento termodinâmico da adsorção. Uma análise estatística dos dados de porosidade foi realizada através dos testes t e F mostrando que, com um nível de confiança de 95%, apenas algumas colunas apresentam porosidades equivalentes embora os erros cometidos na determinação da porosidade total e no processo de empacotamento sejam os mesmos. A recuperação do enantiômero de interesse, S-(-)-omeprazol, variou de 10-100% quando a porosidade total sofreu variações da ordem de 3%. Os gráficos de van Deemter mostraram uma relação linear entre a altura equivalente a um prato e a velocidade superficial da fase móvel. O enantiômero S-(-)- apresentou maiores coeficientes de transferência de massa e o enantiômero R-(+)- maiores constantes de Henry. O fator de separação e a resolução apresentaram valores iguais a 1,30 e 1,96, respectivamente, a $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $1,0\text{ mL/min}$. Observou-se um decréscimo nos valores desses parâmetros após um determinado tempo de uso da coluna. Os valores negativos de ΔS^0 e ΔH^0 indicam um aumento na ordem do sistema cromatográfico e que a adsorção dos enantiômeros da fase móvel na fase estacionária é entalpicamente favorável. O modelo de isoterma de Langmuir foi bem correlacionado aos dados experimentais de equilíbrio no intervalo de concentração analisado.

Palavras-chave: fase estacionária quiral, omeprazol, cromatografia líquida de alta eficiência.

ABSTRACT

The aim of this work was the synthesis, in large scale, of the amylose tris(3,5-dimethylphenylcarbamate) chiral stationary phase and further evaluate in the omeprazole enantiomer preparative separation by high performance liquid chromatography. The amylose carbamate, characterized by elemental analysis and infrared spectroscopy, showed CHN experimental values close to theoretical values and infrared absorptions at 1720 cm^{-1} which is assigned to C=O group, at 1220 cm^{-1} which is assigned to C-N bond and at 3294 cm^{-1} which is assigned to N-H bond. Pulse experiments with solutions of the inert and racemic mixture at different flow rates and temperature were carried out to evaluate column homogeneity and its influence on separation process, axial dispersion and mass transfer coefficients and adsorption thermodynamic behavior. A statistical analysis of the porosity data was performed through of the t and F tests showing that with 95% confidence level only some columns presented equivalent porosities although the errors made in the total porosity determination and packing process are equal. The recovery of the interest enantiomer, S-(-)-omeprazole, varied of 10 until 100% when total porosity varied in the order of 3%. The van Deemter plots showed a linear dependence between height equivalent to a theoretical plate and mobile phase superficial velocity. S-(-)- enantiomer presented higher values of mass transfer coefficients and the enantiomer R-(+)-omeprazole presented higher values of Henry constants. The separation factor and resolution values were 1.30 and 1.96 at $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ and 1.0 mL/min , respectively. It was observed a decrease of these parameter values after a use time of the column. The negative values of ΔS^0 and ΔH^0 indicates an increase in the order of chromatographic system and that the enantiomer adsorption from the mobile phase to stationary phase is enthalpically favorable. The Langmuir isotherm model was well correlated to equilibrium experimental data in the range of investigated concentration.

Key-words: chiral stationary phase, omeprazole, high performance liquid chromatography.

SUMÁRIO

RESUMO	xi
ABSTRACT	xiii
LISTA DE FIGURAS	xix
LISTA DE TABELAS	xxiii
NOMENCLATURA	xxv
CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO	1
1.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS	1
1.2 JUSTIFICATIVA DA PESQUISA.....	2
1.3 OBJETIVO	3
1.4 ESTRUTURA DO TRABALHO	4
CAPÍTULO 2: REVISÃO DA LITERATURA	5
2.1 ENANTIÔMEROS E MOLÉCULAS QUIRAIS	5
2.2 FÁRMACOS UTILIZADOS PARA INIBIR OU NEUTRALIZAR A SECREÇÃO DE ÁCIDO GÁSTRICO	6
2.3 OBTENÇÃO DOS ISÔMEROS OPTICAMENTE ATIVOS.....	8
2.4 MÉTODOS DE OBTENÇÃO DOS ENANTIÔMEROS PUROS POR RESOLUÇÃO CROMATOGRÁFICA DE MISTURAS RACÊMICAS.....	10
2.4.1 Método indireto.....	10
2.4.2 Método direto.....	10
2.5 FORMAÇÃO DO COMPLEXO DIASTEREOISOMÉRICO-TRANSITÓRIO	11
2.6 FASES ESTACIONÁRIAS QUIRAIS BASEADAS EM DERIVADOS DE POLISSACARÍDEOS.....	12

2.7 TERMODINÂMICA DA ENANTIOSEPARAÇÃO	18
2.8 RESOLUÇÃO	21
2.9 MÉTODO DOS MOMENTOS	22
2.10 ALTURA EQUIVALENTE A UM PRATO	24
2.11 ISOTERMAS DE ADSORÇÃO	27
2.11.1 Modelo de Langmuir	28
2.11.2 Determinação das isotermas de adsorção	29
2.11.2.1 Métodos estáticos	29
2.11.2.2 Métodos dinâmicos	29
2.12 MODELAGEM MATEMÁTICA DO PROCESSO CROMATOGRÁFICO	34
2.13 INFLUÊNCIA DA POROSIDADE TOTAL DO LEITO NA CROMATOGRAFIA PREPARATIVA EM BATELADA	35
CAPÍTULO 3: MATERIAIS E MÉTODOS	39
3.1 MATERIAIS	39
3.2 MÉTODOS	40
3.2.1 Preparação das colunas cromatográficas	40
3.2.1.1 Síntese do derivado de polissacarídeo	40
3.2.1.2 Recobrimento do suporte de sílica pelo carbamato	41
3.2.1.3 Empacotamento das colunas cromatográficas	42
3.2.2 Experimentos preliminares	42
3.2.2.1 Definição do modo de eluição	43
3.2.2.2 Avaliação da ordem de eluição do par enantiomérico e do sentido da rotação da luz circularmente polarizada	43
3.2.3 Avaliação das porosidades	43
3.2.4 Avaliação dos coeficientes de dispersão axial e de transferência de massa	45
3.2.5 Avaliação do comportamento termodinâmico da adsorção	45
3.2.5.1 Constantes de Henry	45
3.2.5.2 Influência da temperatura	46

3.2.5.3 <i>Influência da concentração de soluto</i>	46
3.2.6 Avaliação da capacidade de discriminação quiral da fase estacionária em função do tempo de utilização da coluna	47
CAPÍTULO 4: RESULTADOS E DISCUSSÕES	49
4.1 PREPARAÇÃO DAS COLUNAS CROMATOGRÁFICAS.....	49
4.1.1 Síntese do derivado de polissacarídeo	49
4.1.1.1 <i>Caracterização do derivado de polissacarídeo por análise elementar.</i>	49
4.1.1.2 <i>Caracterização do derivado de polissacarídeo por espectroscopia na região do infravermelho</i>	50
4.1.2 Recobrimento do suporte de sílica pelo carbamato	52
4.1.2.1 <i>Caracterização das partículas de sílica e da FEQ por espalhamento de laser</i>	52
4.1.2.2 <i>Caracterização das partículas de sílica e da FEQ por microscopia eletrônica de varredura</i>	54
4.1.3 Empacotamento das colunas cromatográficas	55
4.2 EXPERIMENTOS PRELIMINARES	57
4.2.1 Definição do modo de eluição	57
4.2.2 Avaliação da ordem de eluição do par enantiomérico e do sentido da rotação da luz circularmente polarizada.....	59
4.3 AVALIAÇÃO DAS POROSIDADES.....	60
4.3.1 Avaliação dos erros.....	67
4.3.2 Avaliação da influência da porosidade total na cromatografia preparativa em batelada.....	73
4.4 AVALIAÇÃO DOS COEFICIENTES DE DISPERSÃO AXIAL E DE TRANSFERÊNCIA DE MASSA.....	76
4.5 AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO TERMODINÂMICO DA ADSORÇÃO...	82
4.5.1 Constantes de Henry	82
4.5.2 Influência da temperatura.....	86
4.5.3 Influência da concentração de soluto.....	93

4.6 AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE DISCRIMINAÇÃO QUIRAL DA FASE ESTACIONÁRIA EM FUNÇÃO DO TEMPO DE UTILIZAÇÃO DA COLUNA	96
CAPÍTULO 5: CONCLUSÕES E SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	99
5.1 CONCLUSÕES	99
5.2 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	101
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	103

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1: Demonstração da quiralidade de uma molécula geral, com um estereocentro tetraédrico.....	5
Figura 2.2: Obtenção de compostos opticamente ativos.....	8
Figura 2.3: Requisitos necessários em cada etapa do processo de obtenção dos enantiômeros.....	9
Figura 2.4: Esquema reacional de derivação da amilose e formação do derivado tris(3,5-dimetilfenilcarbamato).....	15
Figura 2.5: Representação esquemática da reação do isocianato com a água, levando à formação do derivado de uréia.....	15
Figura 2.6: Estrutura molecular do derivado de uréia (1,3-di(3'5'-dimetil)fenil uréia).....	16
Figura 2.7: Variação da altura equivalente a um prato em função da velocidade superficial da fase móvel de acordo com a equação de van Deemter.....	26
Figura 2.8: Perfil de eluição um único componente obtido pelo método da análise frontal.....	31
Figura 2.9: Perfil de eluição de uma mistura binária obtido pelo método da análise frontal.....	33
Figura 2.10: Métodos de fracionamento para uma mistura binária.....	36
Figura 4.1: Espectro no infravermelho da amilose.....	51
Figura 4.2: Espectro no infravermelho do carbamato utilizado no preparo da coluna A25.....	51
Figura 4.3: Espectro no infravermelho do carbamato utilizado no preparo das colunas A15 e SP.....	52

Figura 4.4: Distribuição granulométrica das partículas de sílica Luna NH ₂	53
Figura 4.5: Distribuição granulométrica das partículas da FEQ	54
Figura 4.6: MEV das partículas de sílica Luna NH ₂	55
Figura 4.7: MEV das partículas da FEQ obtida	55
Figura 4.8: Espectro no infravermelho do derivado de uréia	57
Figura 4.9: Perfil de eluição dos enantiômeros do omeprazol na FEQ tris(3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose em sílica Luna NH ₂ (100 Å e 9 µm). FM = Hexano:etanol (70:30 v/v).	58
Figura 4.10: Perfil de eluição dos enantiômeros do omeprazol na FEQ tris(3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose em sílica Luna NH ₂ (100 Å e 9 µm). FM = metanol (100%).....	58
Figura 4.11: Perfil de eluição da mistura racêmica e do enantiômero S-(-)-omeprazol.	59
Figura 4.12: Perfil de eluição da mistura racêmica do omeprazol	60
Figura 4.13: Estrutura molecular do 1,3,5-tri-terc-butilbenzeno (TTBB).....	61
Figura 4.14: Avaliação da queda de pressão em função da velocidade superficial da FM. T = 25 °C.....	62
Figura 4.15: Avaliação da queda de pressão em função da velocidade superficial da FM. T = 30 °C.....	63
Figura 4.16: Avaliação da queda de pressão em função da velocidade superficial da FM. T = 40 °C.....	63
Figura 4.17: Avaliação da queda de pressão em função da velocidade superficial da FM. T = 50 °C.....	64
Figura 4.18: Porosidade total em função da vazão da FM e seus respectivos intervalos de confiança.	65

Figura 4.19: Porosidade total em função da temperatura e seus respectivos intervalos de confiança.	66
Figura 4.20: Porosidade total de cada coluna e seus respectivos intervalos de confiança.....	67
Figura 4.21: Diagrama esquemático ilustrando a metodologia de avaliação dos erros pela análise do Teste F. R_1 , R_2 e R_3 representam as réplicas dos tempos de retenção do TTBB na FEQ, σ_{Q1}^2 , σ_{Q2}^2 , σ_{Q3}^2 e σ_{Q4}^2 representam as variâncias dessas réplicas e σ_c^2 representa a variância das porosidades de cada coluna	69
Figura 4.22: Valores do teste F entre as variâncias da porosidade total em diferentes vazões da FM.....	70
Figura 4.23: Valores do teste F entre as variâncias da porosidade total de cada coluna.....	71
Figura 4.24: Valores do teste F entre as variâncias da porosidade total em diferentes temperaturas.....	72
Figura 4.25: Recuperação do enantiômero S(-)-omeprazol considerando variações de 1% na porosidade total.....	75
Figura 4.26: Recuperação do enantiômero S(-)-omeprazol considerando variações de 3% na porosidade total.....	75
Figura 4.27: Gráfico de van Deemter para o TTBB.....	77
Figura 4.28: Gráfico de van Deemter para os enantiômeros do omeprazol. T = 25 °C.	78
Figura 4.29: Gráfico de van Deemter para os enantiômeros do omeprazol. T = 30 °C.	79
Figura 4.30: Gráfico de van Deemter para os enantiômeros do omeprazol. T = 40 °C.	79
Figura 4.31: Gráfico de van Deemter para os enantiômeros do omeprazol. T = 50 °C.	80

Figura 4.32: Constantes de Henry do S-(-)-omeprazol em função da temperatura e seus respectivos intervalos de confiança.	83
Figura 4.33: Constantes de Henry do R-(+)-omeprazol em função da temperatura e seus respectivos intervalos de confiança.	83
Figura 4.34: Constantes de Henry do S-(-)-omeprazol e seus respectivos intervalos de confiança em cada coluna	84
Figura 4.35: Constantes de Henry do R-(+)-omeprazol e seus respectivos intervalos de confiança em cada coluna.	84
Figura 4.36: Valores do Teste F entre as variâncias das constantes de Henry do enantiômero menos retido de cada coluna.....	85
Figura 4.37: Valores do Teste F entre as variâncias das constantes de Henry do enantiômero mais retido de cada coluna.....	85
Figura 4.38: Perfil de eluição dos enantiômeros do omeprazol.	87
Figura 4.39: Gráfico semi-logarítmico do fator de retenção em função da temperatura.	91
Figura 4.40: Gráfico semi-logarítmico do fator de separação em função da temperatura.	91
Figura 4.41: Curva da derivada do perfil de eluição e curva de ruptura da frente de adsorção.....	93
Figura 4.42: Frações coletadas.	94
Figura 4.43: Gráfico de Scatchard dos enantiômeros do omeprazol.....	95
Figura 4.44: Isotermas de adsorção dos enantiômeros do omeprazol obtidas pelo método da análise frontal.....	95
Figura 4.45: Perfil de eluição dos enantiômeros do omeprazol referentes a P1, P2, P3 e P4.....	97

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1: Estrutura dos compostos benzimidazólicos substituídos.....	7
Tabela 2.2: Estrutura química de FEQs baseadas em derivados de amilose e celulose.....	13
Tabela 2.3: Principais FEQs baseadas em derivados de amilose e celulose disponíveis comercialmente	14
Tabela 4.1: Análise elementar: valores teóricos e experimentais para o tris(3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose	50
Tabela 4.2: Tempo de retenção do TTBB no volume morto do sistema cromatográfico.....	61
Tabela 4.3: Porosidades médias das colunas.....	72
Tabela 4.4: Porosidade total de colunas comerciais Chiralpak AD.....	73
Tabela 4.5: Dados de entrada	74
Tabela 4.6: Número de pratos em diferentes temperaturas e vazões da FM para o TTBB	76
Tabela 4.7: Número de pratos em diferentes temperaturas e vazões para os enantiômeros do omeprazol.....	76
Tabela 4.8: Coeficiente de transferência de massa para o TTBB.....	78
Tabela 4.9: Coeficientes de dispersão axial e de transferência de massa para os enantiômeros do omeprazol.....	81
Tabela 4.10: Coeficientes de dispersão axial e de transferência de massa para os enantiômeros do omeprazol (ROSA, 2005)	82

Tabela 4.11: Constantes de Henry.....	86
Tabela 4.12: Parâmetros cromatográficos a 1,0 mL/min.....	88
Tabela 4.13: Parâmetros cromatográficos a 2,0 mL/min.....	88
Tabela 4.14: Parâmetros cromatográficos a 3,0 mL/min.....	88
Tabela 4.15: Parâmetros cromatográficos a 4,0 mL/min.....	88
Tabela 4.16: Parâmetros cromatográficos encontrados na literatura referentes à separação enantiomérica do omeprazol.....	90
Tabela 4.17: Parâmetros termodinâmicos (Coluna SP1).....	92
Tabela 4.18: Parâmetros do modelo de Langmuir.....	96
Tabela 4.19: Parâmetros cromatográficos	96

NOMENCLATURA

A, B e C	Coeficientes da Equação 2.22
a_i	Coeficiente de distribuição da Equação 2.26
b_i	Constante de equilíbrio de adsorção da Equação 2.26 [mL.mg ⁻¹]
c_i	Concentração do componente i na fase líquida [mg.mL ⁻¹]
$c_{i,a}$	Concentração do componente i na alimentação em $t < 0$ [mg.mL ⁻¹]
$c_{i,b}$	Concentração do componente i na segunda frente da curva de ruptura [mg.mL ⁻¹]
$c_{i,pi}$	Concentração do componente i no platô intermediário [mg.mL ⁻¹]
ΔG^0	Variação da energia livre de Gibbs de adsorção [J.mol ⁻¹]
$\Delta(\Delta G^0)$	Diferença da variação da energia livre de Gibbs das interações dos enantiômeros R e S com a fase estacionária quiral [J.mol ⁻¹]
ΔH^0	Variação de entalpia de adsorção [J.mol ⁻¹]
$\Delta(\Delta H^0)$	Diferença da variação de entalpia das interações dos enantiômeros R e S com a fase estacionária [J.mol ⁻¹]
ΔS^0	Variação de entropia de adsorção [J.mol ⁻¹ .K ⁻¹]
$\Delta(\Delta S^0)$	Diferença da variação de entropia das interações dos enantiômeros R e S com a fase estacionária [J.mol ⁻¹ .K ⁻¹]
d_p	Diâmetro da partícula [μ m]
d_R	Distância de retenção do soluto (ponto máximo do pico)
D_L	Coeficiente de dispersão axial [cm ² .s ⁻¹]
D_m	Difusividade molecular [cm ² .s ⁻¹]
H	Constante de Henry
$HETP$	Altura equivalente a um prato [cm]
k	Fator de retenção
k_m	Coeficiente de transferência de massa global [min ⁻¹]
k_R	Fator de retenção do enantiômero R

k_S	Fator de retenção do enantiômero <i>S</i>
K	Constante de equilíbrio de adsorção
n_E	Número de moléculas do soluto na fase estacionária
n_M	Número de moléculas do soluto na fase móvel
N	Número de pratos
q_i	Concentração do componente <i>i</i> na fase sólida [mg.mL ⁻¹]
q_s	Capacidade de saturação do adsorvente [mg.mL ⁻¹]
Q	Vazão da fase móvel [mL.min ⁻¹]
R	Constante universal dos gases [0,082 atm.L.mol ⁻¹ .K ⁻¹]
R_S	Resolução entre picos adjacentes
t_M	Tempo de retenção de um componente não-retido pela fase estacionária [min]
t_{total}	Tempo total de retenção [min]
t_R	Tempo de retenção do soluto [min]
t_{RR}	Tempo de retenção do enantiômero <i>R</i> [min]
t_{RS}	Tempo de retenção do enantiômero <i>S</i> [min]
t_{V_0}	Tempo de retenção no volume morto que considera as tubulações e conexões do sistema de análise na ausência da coluna [min]
T	Temperatura absoluta [K]
T_{iso}	Temperatura isoenantioseletiva [K]
u	Velocidade superficial da fase móvel [cm.s ⁻¹]
u_*	Velocidade intersticial da fase móvel ($u_* = u/\epsilon$) [cm.s ⁻¹]
V_0	Volume morto da coluna [mL]
V_a	Volume de adsorvente [mL]
V_c	Volume da coluna [mL]
V_1	Volume de retenção do ponto de inflexão da curva de ruptura na etapa de adsorção [mL]
$V_{1,ads}$	Volume de retenção da primeira frente da curva de ruptura na etapa de adsorção [mL]

$V_{1,des}$	Volume de retenção da primeira frente da curva de ruptura na etapa de dessorção [mL]
V_2	Volume de retenção da segunda frente da curva de ruptura nas etapas de adsorção e dessorção
V_M	Volume da fase móvel eluída da coluna durante a passagem de um componente não retido pela fase estacionária [mL]
V_T	Volume morto total (volume morto do sistema mais o volume morto da coluna [mL])
w_b	Largura da banda cromatográfica na base (entre tangentes)
w_{bR}	Largura da banda cromatográfica na base do enantiômero <i>R</i>
w_{bS}	Largura da banda cromatográfica na base do enantiômero <i>S</i>
w_h	Largura da banda cromatográfica a meia altura
w_{hR}	Largura da banda cromatográfica a meia altura do enantiômero <i>R</i>
w_{hS}	Largura da banda cromatográfica a meia altura do enantiômero <i>S</i>

LETRAS GREGAS

α	Fator de separação (picos adjacentes)
φ	Razão entre o volume da fase estacionária e o volume da fase móvel
μ	Primeiro momento
$\overline{\mu}_2$	Segundo momento
σ^2	Variância
ε_T	Porosidade total da coluna
ε	Porosidade do leito
ε_p	Porosidade da partícula
λ	Comprimento de onda [nm]
γ_1 e γ_2	Parâmetros da Equação 2.21

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

1.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS

A atividade biológica ou química de uma substância depende, muitas vezes, da sua estereoquímica (PIRKLE; POCHAPSKY, 1989).

Estudos metabólicos e farmacológicos são procedimentos padrões no desenvolvimento e testes de novos fármacos quirais, em ambas as formulações, mistura racêmica ou único enantiômero (WAINER et al., 1995).

No que diz respeito à farmacodinâmica, é comum haver diferença de afinidade entre os enantiômeros com o receptor, o que leva a uma diferença de atividade farmacológica. Essas diferenças de atividade também são observadas com relação aos efeitos adversos, que podem estar relacionados tanto com o eutômero, que é o enantiômero ativo, quanto com o distômero, enantiômero que não apresenta atividade terapêutica. Praticamente em todas as etapas da biotransformação de um fármaco quiral pode-se observar diferenças nas propriedades farmacológicas entre os enantiômeros, exceto na absorção por difusão passiva, já que estes possuem características físico-químicas semelhantes. Porém, se a absorção for por difusão facilitada ou ativa, essa pode ser preferencial para um dos enantiômeros, em virtude das diferentes afinidades pelos carreadores da membrana. Ainda na etapa de biotransformação, devido a estereoseletividade das enzimas, em vários graus, a velocidade de metabolização é geralmente diferente para cada isômero (NOËL et al., 2004).

Atualmente, a maioria dos fármacos quirais é comercializada na forma de mistura racêmica. No entanto, devido a incontestável influência do estereoisomerismo sobre as propriedades físico-químicas, cinéticas e dinâmicas de fármacos quirais (NOËL et al., 2004), autoridades governamentais que regularizam a produção, o registro e a distribuição

de medicamentos, como o *Food and Drug Administration* (FDA) nos Estados Unidos (UNITED STATES FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 1992) e órgão similar no Canadá (THERAPEUTIC PRODUCTS PROGRAMME, 2000), têm destacado a importância do planejamento e síntese de novos produtos farmacêuticos na forma de enantiômeros puros. No Brasil as únicas legislações que fazem referência sobre o assunto são o regulamento técnico para medicamentos genéricos (RESOLUÇÃO-RDC, nº 135, 2003) e o regulamento técnico para medicamentos novos ou inovadores com princípios ativos sintéticos ou semi-sintéticos (RESOLUÇÃO-RDC, nº 136, 2003).

1.2 JUSTIFICATIVA DA PESQUISA

A administração de fármacos preparados a partir de enantiômeros puros apresenta uma maior eficiência e ocasionam menos efeitos colaterais do que os fármacos comercializados como mistura racêmica, geralmente misturas equimolares de ambos os enantiômeros (GRAFF, 2002). Por outro lado, fármacos já comercializados como racematos estão sendo exaustivamente estudados, com a finalidade de se avaliar qual a influência do estereoisomerismo sobre as suas propriedades farmacológicas e verificar quais as vantagens existentes na produção do enantiômero puro (TUCKER, 2000). Por esses motivos, muitos métodos de enantioseparação têm sido amplamente estudados (GASPARRINI; MISITI; VILLANI, 2001).

O omeprazol, originalmente desenvolvido e administrado durante muitos anos como mistura racêmica, agora é comercializado como enantiômero puro pela AstraZeneca AB (Södertälje, Suécia) (ORLANDO; BONATO, 2003). O S-(-)-omeprazol (esomeprazol magnésio), registrado como Nexium[®], tem sido alvo de estudos comparativos em relação à mistura racêmica por apresentar menor variabilidade do pH intragástrico e uma maior biodisponibilidade permitindo um melhor controle da secreção ácida estomacal (KAHRILAS et al., 2000; LIND et al., 2000).

Nesse sentido, vários autores estudaram a separação dos enantiômeros do omeprazol em diferentes fases estacionárias quirais. Colunas comerciais baseadas em proteínas, sendo estas, Chiral-AGP, Ultron-ES-OVM e BSA-DSC, foram utilizadas por BALMÉR; PERSSON; LARGERSTRÖM, 1994 e BONATO et al., 2002. As colunas

comerciais baseadas em polissacarídeos, Chiracel OD-H, Chiracel OB-H, Chiracel OJ, Chiracel OD-R, Chiracel OJ-R, Chiralpak AD, Chiralpak AD-RH, Chiralpak AS foram avaliadas por BALMÉR; PERSSON; LARGERSTRÖM, 1994; BONATO et al., 2002; KANAZAWA et al., 2003; ORLANDO; BONATO, 2003 e STENHOFF; BLOMQVIST; LAGERSTRÖM, 1999. ERLANDSSON et al. (1990) utilizaram uma coluna quiral preparada em laboratório contendo a fase estacionária trisfenilcarbamoilcelulose e CASS; DEGANI; CASSIANO (2000) a fase tris(3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose. DEL NOZAL et al. (2004) e TORIBIO et al. (2006) investigaram a separação enantiomérica do omeprazol em Chiralpak AD por cromatografia supercrítica. WEI; SHEN; CHEN (2006) estudaram a separação cromatográfica dos enantiômeros do omeprazol em leito móvel simulado, utilizando a fase estacionária quiral trisfenilcarbamato de celulose. ANDERSSON; JUZA (2003) patentearam o processo de separação enantiomérica dos compostos benzimidazólicos substituídos (omeprazol, pantoprazol, lansoprazol ou rabeprazol) em leito móvel simulado usando tris(S)-metil-benzilcarbamato de amilose como fase estacionária quiral. Com exceção de ROSA (2005), que avaliou a separação cromatográfica dos enantiômeros em uma coluna semipreparativa contendo a fase estacionária quiral O,O'-bis[terc-butilbenzoil]N,N'-dialil-L-tartardiamida, conhecida comercialmente como Kromasil CHI-TBB, todos os trabalhos mencionados acima utilizaram colunas analíticas.

1.3 OBJETIVO

Devido à influência da quiralidade sobre as propriedades físicas e biológicas das moléculas, à crescente demanda por isômeros opticamente puros e o elevado custo para a aquisição de fases estacionárias quirais comerciais, este trabalho teve como objetivo principal sintetizar a fase estacionária quiral tris(3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose, visando o aumento da escala sintética a partir de uma metodologia definida em escala analítica, e a separação enantiomérica do omeprazol em escala preparativa por cromatografia líquida de alta eficiência.

Os objetivos específicos envolveram a avaliação da homogeneidade das colunas e sua influência no processo de separação, a avaliação dos coeficientes de dispersão axial e de transferência de massa e a avaliação do comportamento termodinâmico da adsorção.

A homogeneidade das colunas foi analisada pela porosidade total e a avaliação do comportamento termodinâmico compreendeu a determinação das constantes de Henry, variações de entalpia e entropia e isotermas de adsorção.

1.4 ESTRUTURA DO TRABALHO

Nos próximos capítulos são abordados: a revisão bibliográfica pertinente ao objetivo do trabalho, os materiais e a metodologia utilizada nos experimentos, os resultados obtidos e a discussão dos mesmos, as conclusões e as sugestões para trabalhos futuros.

A revisão bibliográfica é realizada no Capítulo 2. São apresentados os aspectos teóricos mais relevantes para a compreensão do processo de separação de misturas racêmicas por cromatografia líquida de alta eficiência.

No Capítulo 3 segue os materiais utilizados e a metodologia empregada na realização dos experimentos.

No Capítulo 4 são apresentados e discutidos os resultados obtidos.

No Capítulo 5 são apresentadas as conclusões e sugestões para trabalhos futuros.

CAPÍTULO 2

REVISÃO DA LITERATURA

2.1 ENANTIÔMEROS E MOLÉCULAS QUIRAIS

Os enantiômeros são estereoisômeros cujas moléculas são imagens especulares umas das outras, que não se superpõem. A enantiomeria só ocorre em compostos cujas moléculas são quirais. A palavra quiral provém do grego *cheir*, que significa mão. Uma molécula quiral se define como uma molécula que não é idêntica à sua imagem especular (Figura 2.1). É possível reconhecer a existência de um par de enantiômeros quando a molécula contém um átomo tetraédrico central a qual se ligam quatro substituintes diferentes e a ausência de um plano de simetria ou plano especular (plano imaginário que corta a molécula de tal forma que as duas metades sejam uma a imagem especular da outra) (SOLOMONS; FRYHLE, 2000).

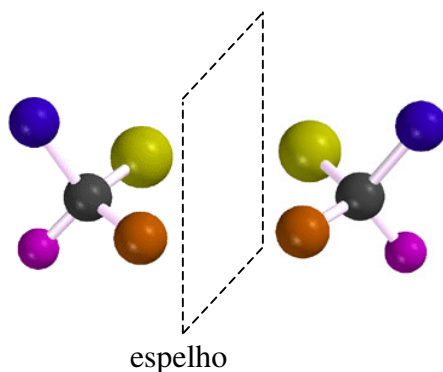


Figura 2.1: Ilustração da quiralidade de uma molécula geral, com um estereocentro tetraédrico (SOLOMONS; FRYHLE, 2000).

Uma importante propriedade dos enantiômeros é que a permuta de quaisquer dois grupos ligados ao átomo central converte um enantiômero no outro, ou seja, a um estereoisômero. Em virtude dessa propriedade, o átomo no qual estão ligados os grupos de natureza diferentes é denominado estereocentro ou centro estereogênico. No entanto, muitas moléculas quirais podem possuir mais de um estereocentro e não ter um átomo tetraédrico com quatro grupos diferentes. Os enantiômeros, isoladamente, provocam a rotação do plano da luz plano-polarizada e são opticamente ativos. Têm rotações específicas de mesmo valor, porém de sinais opostos. As moléculas dos enantiômeros apresentam propriedades físicas iguais tais como: ponto de fusão, ponto de ebulição, índices de refração, espectros de infravermelho, solubilidade em solventes comuns. Os enantiômeros só exibem comportamento diferente quando interagem com outras substâncias quirais (SOLOMONS; FRYHLE, 2000).

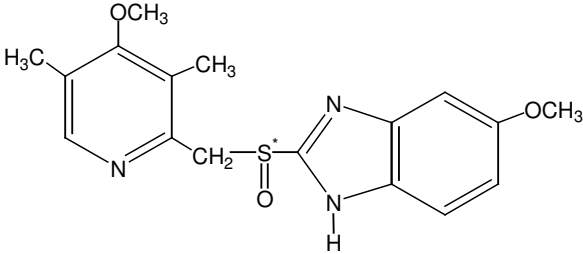
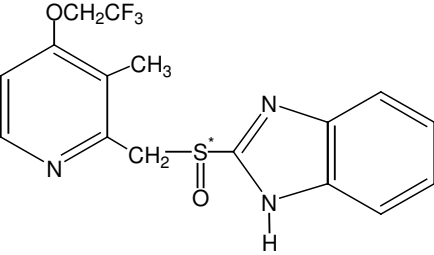
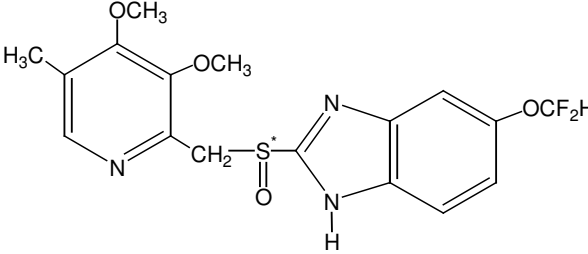
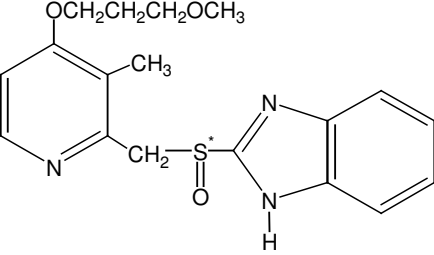
2.2 FÁRMACOS UTILIZADOS PARA INIBIR OU NEUTRALIZAR A SECREÇÃO DE ÁCIDO GÁSTRICO

A dispepsia, em suas muitas formas, tem sido companheira da espécie humana desde o aparecimento das más comidas, dos excessos alimentares e da ansiedade. Durante séculos, a neutralização do ácido gástrico com antiácidos foi o único alívio para a dor das úlceras. Ensaio clínicos de antagonistas que atuam nos receptores H_2 -histaminérgicos forneceram uma classe mais específica de inibidores da secreção de ácido gástrico. Os inibidores benzimidazólicos substituídos da H^+/K^+ ATPase (omeprazol, lansoprazol, pantoprazol e rabeprazol), mostrados na Tabela 2.1 (ANDERSSON; JUZA, 2003), oferecem um meio muito eficaz de bloquear seletivamente a bomba de prótons responsável pela secreção de ácido pela célula parietal (BRUNTON, 1996).

O omeprazol atua através da inibição irreversível da H^+/K^+ ATPase (a bomba de prótons), que constitui a etapa terminal na via da secreção ácida. Inibe acentuadamente a secreção de ácido gástrico tanto basal quanto estimulada. É inativo em pH neutro, mas, por ser uma base fraca, acumula-se no meio ácido dos canalículos das células parietais estimuladas, onde é ativado. Esse acúmulo preferencial em áreas de pH muito baixo, como a que ocorre singularmente nos canalículos secretórios das células parietais gástricas,

significa que esse fármaco exerce um efeito específico sobre essas células (RANG et al., 2001).

Tabela 2.1: Estrutura dos compostos benzimidazólicos substituídos.

Nome farmacológico	Estrutura
Omeprazol	
Lansoprazol	
Pantoprazol	
Rabeprazol	

Fonte: DEL NOZAL et al., 2004.

2.3 OBTENÇÃO DOS ISÔMEROS OPTICAMENTE ATIVOS

Os compostos enantiomericamente puros podem ser obtidos por síntese estereoseletiva (produção de um único enantiômero) ou a partir de uma mistura racêmica (produção de ambos enantiômeros) ((Figura 2.2) (FRANCOTTE, 1994).

Na síntese estereoseletiva, para que haja a formação preponderante de um dos enantiômeros é necessário que substratos quirais e pró-quirais influenciem o desenvolvimento da reação. Neste caso, auxiliares, reagentes e catalisadores quirais são utilizados. A dificuldade deste método está relacionada à pureza óptica desejada dos produtos (BAIRD; TAYLOR, 1995; FRANCOTTE, 1994; PINHEIRO; FERREIRA, 1998; VERSTEEG et al., 1995).

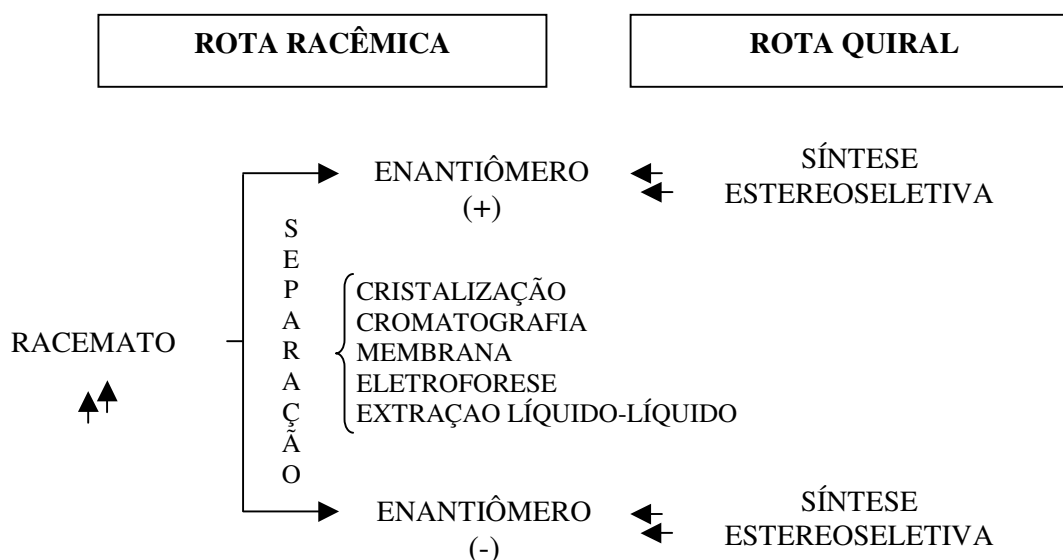


Figura 2.2: Obtenção de compostos opticamente ativos (FRANCOTTE, 2001).

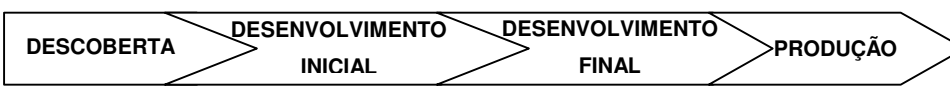
No método racêmico, o racemato é obtido por uma seqüência de reações com menor grau de dificuldade comparado às correspondentes formas opticamente ativas. Em seguida, a separação dos enantiômeros é obtida por recristalização, cromatografia ou membrana (FRANCOTTE, 1994, 2001). A enantioseparação por cromatografia pode ser realizada utilizando-se uma fase estacionária aquiral e um solvente ou aditivo quiral

adicionado à fase móvel ou uma fase estacionária quiral (FEQ) (FRANCOTTE; BUCHHEIT, 1992).

As principais vantagens do emprego da cromatografia, quiral ou aquiral, são: aplicação a uma variedade de misturas racêmicas; obtenção de ambos enantiômeros; técnica rápida e relativamente fácil; alto grau de pureza óptica dos enantiômeros isolados e separação dos enantiômeros de misturas racêmicas, cujos compostos racemizam facilmente ou apresentam quiralidade tipo hélice ou helicoidal. Porém, o elevado custo das fases estacionárias e as dificuldades associadas ao reciclo da fase móvel são alguns empecilhos do *scale-up* (FRANCOTTE, 1994).

Durante a fase de testes preliminares do enantiômero biologicamente ativo, a síntese enantiosseletiva, a qual requer um tempo demasiadamente longo na obtenção do enantiômero, pode ser substituída pelo método cromatográfico. Além disso, ambos enantiômeros são obtidos em quantidades suficientes para a realização de testes biológicos comparativos (FRANCOTTE; BUCHHEIT, 1992).

A Figura 2.3 mostra os requisitos necessários em cada etapa do processo de obtenção de enantiômeros puros a partir de misturas quirais (FRANCOTTE, 2001, 2005).



	DESCOBERTA	DESENVOLVIMENTO INICIAL	DESENVOLVIMENTO FINAL	PRODUÇÃO
QUANTIDADE	mg-50 g	100 g-10 kg	5-100 kg	toneladas
ISÔMERO NECESSÁRIO	ambos enantiômeros	ambos enantiômeros	enantiômero (s) ativo (s)	enantiômero (s) ativo (s)
TEMPO	dias	semanas	meses	-
CUSTO	baixo	baixo	médio	alto
IMPORTÂNCIA DO SCALE-UP	pequena	média	grande	pré-requisito

Figura 2.3: Requisitos necessários em cada etapa do processo de obtenção dos enantiômeros (FRANCOTTE, 2001).

2.4 MÉTODOS DE OBTENÇÃO DOS ENANTIÔMEROS PUROS POR RESOLUÇÃO CROMATOGRÁFICA DE MISTURAS RACÊMICAS

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é a técnica mais utilizada na determinação do excesso ou pureza enantiomérica da matéria-prima e de formulações farmacêuticas comercializadas como enantiômeros puros. Nesse caso, os enantiômeros podem ser resolvidos tanto pelo método indireto quanto pelo método direto de separação (BONATO; JABOR; GAITANI, 2005).

2.4.1 Método indireto

No procedimento indireto, a derivação dos enantiômeros com um reagente quiral e enantiomericamente puro conduz à formação de um par de diastereoisômeros que, por apresentarem propriedades físico-químicas diferentes, podem ser separados empregando-se fases estacionárias aquirais (CASS et al., 1991). As vantagens desse procedimento são a disponibilidade comercial de reagentes para a derivação de vários grupos funcionais e a alta flexibilidade com relação às condições cromatográficas. No entanto, o tempo demasiadamente longo atribuído à reação de derivação, o requerimento de reagentes opticamente puros, a possibilidade de racemização do reagente durante a formação dos diastereoisômeros ou seu armazenamento, a variação no rendimento da formação dos diastereoisômeros e a necessidade de um tratamento químico posterior para a recuperação dos enantiômeros são as desvantagens apresentadas pelo método (JARDIM; COLLINS; GUIMARÃES, 2006).

2.4.2 Método direto

O procedimento direto fundamenta-se na diferença de estabilidade dos complexos diastereoisoméricos formados entre os enantiômeros e a fase estacionária quiral, devido às diferentes forças (atração ou repulsão) de interação simultânea. As vantagens desse procedimento são: análises cromatográficas rápidas, recuperação dos enantiômeros com relativa facilidade, existência de várias colunas quirais disponíveis comercialmente e dispensável derivação preliminar do soluto, senão para melhorar as características de

detecção quando presentes em matrizes complexas (JARDIM; COLLINS; GUIMARÃES, 2006).

Porém, os métodos que empregam essa técnica requerem um alto investimento de capital devido ao elevado custo da fase estacionária quiral e elevados volumes de solventes orgânicos que compõem a fase móvel para a eluição do fármaco, os quais são caros e podem levar à contaminação ambiental se não forem descartados corretamente (BONATO; JABOR; GAITANI, 2005). Além disso, como o produto encontra-se diluído na fase móvel, um elevado consumo de energia é inevitável para recuperar o composto desejado (REKOSKE, 2001).

Duas estratégias são fundamentalmente aplicadas na separação direta dos enantiômeros por cromatografia com FEQs. A primeira consiste em selecionar ou adaptar a FEQ ao composto racêmico de interesse. Isso é feito por meio de uma avaliação aleatória das FEQs disponíveis, escolha baseada em experiência pessoal ou banco de dados ou pela síntese de uma FEQ específica. A segunda estratégia consiste em adaptar o soluto a uma FEQ particular por meio da derivação do racemato ou mudança para um precursor do composto desejado (FRANCOTTE, 2001).

2.5 FORMAÇÃO DO COMPLEXO DIASTEREISOMÉRICO-TRANSITÓRIO

Em um meio quiral dois enantiômeros são considerados compostos fisicamente distintos. Devido a conformação espacial dos átomos, os enantiômeros interagem diferentemente com a fase estacionária (FRANCOTTE; BUCHHEIT, 1992).

A resolução de uma mistura racêmica em colunas quirais ocorre devido à formação de um complexo diastereoisomérico-transitório (CANCELLIERE et al., 2006), com diferentes energias de interação, entre os enantiômeros e o seletor quiral da fase estacionária, por meio de forças de ligação intermoleculares como ligações de hidrogênio, interações π - π , dipolo-dipolo, complexos de inclusão e impedimento estérico. O seletor quiral é adsorvido fisicamente ou ligado quimicamente ao suporte de sílica (JARDIM; COLLINS; GUIMARÃES, 2006; SVEC; WULFF; FRÉCHET, 2001).

Embora o processo de difusão nas cavidades da matriz quiral não envolva nenhum tipo de ligação, os enantiômeros estão em um meio quiral e o reconhecimento é totalmente estérico. Fases estacionárias com cavidades quirais, como a ciclodextrina, apresentam

equivalente mecanismo de discriminação. Além disso, FEQs protéicas e poliméricas formam complexos diastereoisoméricos envolvendo interações atrativas ou repulsivas e cavidades quirais (PIRKLE; POCHAPSKY, 1989).

2.6 FASES ESTACIONÁRIAS QUIRAIS BASEADAS EM DERIVADOS DE POLISSACARÍDEOS

Nas últimas duas décadas, inúmeros seletores quirais têm sido avaliados em relação à sua capacidade de resolução quiral e emprego em centenas de fases estacionárias quirais. Dentre essas fases, aquelas que se mostraram mais promissoras, quanto à enantioseparação de uma ampla classe de compostos quirais, estão disponíveis comercialmente para separações em escala preparativa e são empregadas em aplicações diversas. Para a análise de fármacos quirais e seus metabólitos, a literatura destaca o sucesso das fases estacionárias quirais baseadas em derivados de polissacarídeos (BONATO; JABOR; GAITANI, 2005; CASS et al., 1997b).

Celulose e amilose são polímeros com atividade óptica encontrados em maior abundância na natureza (YASHIMA, 2001). A amilose é um polissacarídeo formado por longas cadeias não ramificadas de unidades D-glicose conectadas por ligações ($\alpha 1 \rightarrow 4$), enquanto a celulose é um polissacarídeo não ramificado, de 10 a 15 mil unidades de D-glicose, unidas por ligações glicosídicas do tipo ($\beta 1 \rightarrow 4$). Devido à diferença entre as configurações dos resíduos de glicose, a amilose e celulose apresentam estruturas tridimensionais e propriedades físicas muito diferentes entre si (NELSON; COX, 2005; STRYER, 1988). *In natura*, apresentam propriedades mecânicas fracas e limitada capacidade de resolução quiral (YASHIMA, 2001).

Entretanto, a derivação desses polissacarídeos em acetatos, benzoatos, triésteres e fenilcarbamatos conduz à formação de novos sítios de reconhecimento quiral para a separação dos enantiômeros de uma variedade de compostos racêmicos, melhorando assim, as propriedades cromatográficas e enantiosseletivas (JARDIM; COLLINS; GUIMARÃES, 2006; OKAMOTO; KAIDA, 1994; PIRKLE; POCHAPSKY, 1989; YASHIMA; OKAMOTO, 1995).

As Tabelas 2.2 e 2.3 mostram, respectivamente, a estrutura química de algumas FEQs baseadas em derivados de amilose e celulose e as FEQs produzidas pela Daicel Chemical Industries Ltd (Tóquio, Japão).

Tabela 2.2: Estrutura química de FEQs baseadas em derivados de amilose e celulose.

Estrutura química	R	Seletor quiral
	CH ₃	Triacetato de celulose
		Tribenzoato de celulose
		Tris(4-metilbenzoato) de celulose
		Tris(4-metilfenilcarbamato) de celulose
		Tris(3,5-dimetilfenilcarbamato) de celulose
		Tris(4-clorofenilcarbamato) de celulose
		Tris(3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose
		Tris[(S)-fenilcarbamato] de amilose

Fonte: FRANCOTTE, 2005.

Tabela 2.3: Principais FEQs baseadas em derivados de amilose e celulose disponíveis comercialmente.

Polissacarídeo	Derivado	Nome comercial
Celulose	Benzoato	Chiracel OB
		Chiralcel OB-H
	3,5-dimetilfenil carbamato	Chiralpak IB-H
		Chiralcel OD
		Chiralcel OD-H
		Chiralcel OD-R
		Chiralcel OD-RH
		Chiralcel OJ
		4-metilbenzoato
	4-metilfenil carbamato	Chiralcel OJ-H
	4-clorofenil carbamato	Chiralcel OJ-RH
	Cinimato	Chiralcel OG
	Fenil carbamato	Chiralcel OF
Amilose	3,5-dimetilfenil carbamato	Chiralcel OK
		Chiralcel OC
		Chiralpak IA-H
	(S)- α -metilbenzil carbamato	Chiralpak AD
		Chiralpak AD-H
		Chiralpak AD-RH
(S)- α -metilbenzil carbamato	Chiralpak AS	
	Chiralpak AS-H	
	Chiralpak AS-RH	

A denominação “H” significa fase estacionária preparada com sílica de 5 μ m e ao uso da coluna no modo normal de eluição. A denominação “R” é referente ao uso da coluna no modo fase reversa (BONATO; JABOR; GAITANI, 2005; ZHANG; FRANCO, 2007).

A Figura 2.4 mostra a formação do derivado tris(3,5-dimetilfenilcarbamato), proveniente da reação da amilose com o 3,5-dimetilfenil isocianato, utilizado neste trabalho.

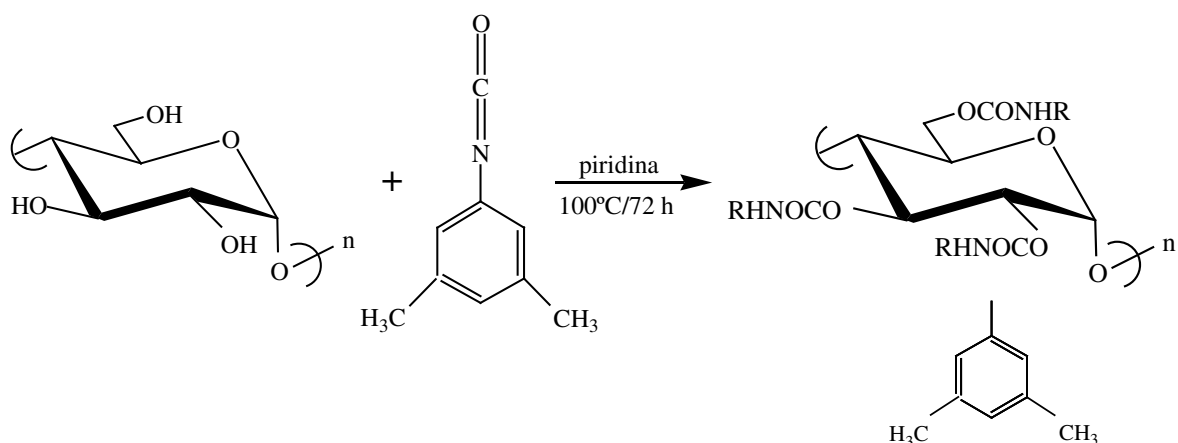


Figura 2.4: Esquema reacional de derivação da amilose e formação do derivado tris(3,5-dimetilfenilcarbamato).

A reação de derivação do polissacarídeo deve ser realizada em condições anídras para se evitar a ocorrência de reações secundárias, uma vez que o isocianato em presença de água (Figura 2.5) produz ácido carbâmico que pela eliminação de gás carbônico conduz a formação de uma amina primária, a qual reage com o isocianato formando um derivado de uréia (Figura 2.6) (DEGANI, 2001).

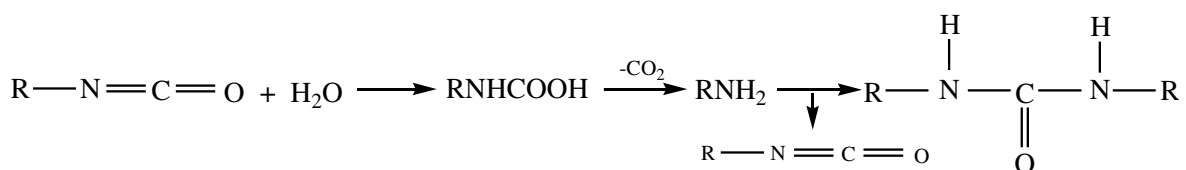


Figura 2.5: Representação esquemática da reação do isocianato com a água, levando à formação do derivado de uréia.

A temperatura da reação também deve ser rigorosamente controlada, dado que em temperaturas inferiores a 100 °C a reação entre o polissacarídeo e o isocianato não é completa e, temperaturas mais elevadas que esta podem levar a caramelização do carboidrato (COIMBRA, 2007).

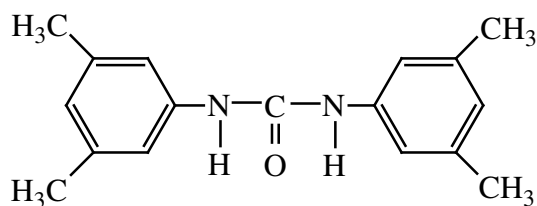


Figura 2.6: Estrutura molecular do derivado de uréia (1,3-di(3'5'-dimetil)fenil uréia).

O mecanismo de reconhecimento quiral tem sido extensivamente investigado e refere-se à capacidade da fase estacionária quiral em interagir de maneira diferente e preferencial com os dois enantiômeros, conduzindo a sua separação (PIRKLE; POCHAPSKY, 1989; JARDIM; COLLINS; GUIMARÃES, 2006).

Derivados de amilose apresentam cavidades helicoidais formadas entre as unidades de D-glicose com os grupos carbamatos localizados no interior e os grupos aromáticos hidrofóbicos localizados mais externamente. A resolução quiral está vinculada ao ajuste dos enantiômeros nas cavidades do polissacarídeo e às interações com os grupos carbamatos (YASHIMA, 2001; YASHIMA; OKAMOTO, 1995).

Nos derivados tris(fenilcarbamato)s, os principais sítios de adsorção são os grupos carbamatos polares. Estes grupos interagem com os enantiômeros via ligações de hidrogênio com os grupos NH e C=O e interações dipolo-dipolo com os grupos C=O. Ainda que menos expressivas que as interações polares, as interações π - π entre o grupo fenila da fase estacionária e os grupos aromáticos do soluto devem ser consideradas. A discriminação quiral destes derivados é significativamente influenciada pela natureza, posição e número de substituintes do grupo fenila (CHANKVETADZE; YASHIMA; OKAMOTO, 1995; OKAMOTO; KAIDA, 1990, 1994; OKAMOTO; KAWASHIMA; HATADA, 1986; YASHIMA, 2001; YASHIMA; OKAMOTO, 1995; ZDZISLAW et al., 1999; ZHAO; PRITTS, 2007).

Derivados com substituintes doadores ou aceptores de elétrons nas posições 3-e/ou 4- apresentam melhor resolução óptica em relação aos derivados não substituídos e aos substituídos na posição 2-. A densidade eletrônica do oxigênio da carbonila e a acidez do próton NH aumentam, respectivamente, com a capacidade dos substituintes em doar e retirar elétrons. Porém, quando estes substituintes são grupos metóxi ou nitro há um decréscimo no poder de discriminação, devido à alta polaridade, interação desses grupos com o soluto ou desarranjo da estrutura dos derivados (OGUNI; ODA; ICHIDA, 1995;

OKAMOTO; KAWASHIMA; HATADA, 1986; OKAMOTO; KAIDA, 1990, 1994; YASHIMA, 2001; YASHIMA; OKAMOTO, 1995).

CHANKVETADZE; YASHIMA; OKAMOTO (1993, 1994, 1995) prepararam uma série de dimetil- dicloro- e clorometilfenilcarbamatos de celulose e amilose. Os derivados substituídos com cloro e metil apresentaram capacidade de discriminação quiral superior aos derivados dicloro ou dimetil. Substituintes doadores ou aceptores de elétrons nas posições *meta*- ou *para*- do grupo fenila aumentou a capacidade de resolução óptica dos fenilcarbamatos. No entanto, os carbamatos de celulose *orto*-substituídos exibiram menor poder de resolução quando comparados aos carbamatos de amilose substituídos na mesma posição.

A capacidade de discriminação quiral dos derivados de amilose é totalmente distinta dos correspondentes derivados de celulose (CASS et al., 1997a; OKAMOTO; KAWASHIMA; HATADA, 1984) e em alguns casos, observa-se a inversão da ordem de eluição dos enantiômeros, provavelmente devido à configuração do resíduo de glicose e diferente estrutura regular do polissacarídeo (BARGMANN-LEYDER; TAMBUTÉ; CAUDE, 1995; CHANKVETADZE et al., 2002; KAIDA; OKAMOTO, 1992; OKAMOTO et al., 1990; OKAMOTO; KAIDA, 1990, 1994). A conformação depende do polissacarídeo, do substituinte do grupo fenila e do solvente utilizado na etapa de recobrimento (OGUNI; ODA; ICHIDA, 1995).

As FEQs baseadas em derivados de polissacarídeos, principalmente amilose e celulose, imobilizadas em sílica por meio de adsorção física, são solúveis em muitos solventes orgânicos como tetrahidrofurano, dioxano, tolueno, acetato de etila, entre outros. Esta propriedade restringe consideravelmente a escolha da fase móvel a solventes compatíveis, nos quais os derivados não são solúveis (FRANCO et al., 2001; FRANCOTTE, 2001).

A restrição do uso de colunas baseadas em derivados de polissacarídeos em um único modo de eluição torna o processo de separação muitas vezes dispendioso. Alguns autores relatam a aplicação de colunas baseadas em derivados de polissacarídeos nos três modos de eluição, normal, reverso e polar orgânico (CASS; DEGANI; CASSIANO, 2000; CIRILLI et al., 2006).

Alguns pesquisadores desenvolveram fases estacionárias mais estáveis, através da imobilização química do seletor quiral no suporte cromatográfico, na tentativa de solucionar o problema relacionado à solubilidade da fase estacionária em determinados solventes orgânicos (FELIX, 2001; FRANCO et al., 1998, FRANCO et al., 2001; FRANCOTTE, 2001; GRIEB et al., 1995; OKAMOTO et al., 1987; OLIVEROS et al., 1995, OLIVEROS; SENSO; MINGUILLÓN., 1997, OLIVEROS et al., 1998; STALCUP; WILLIAMS, 1995; YASHIMA; FUKAYA; OKAMOTO, 1994). ANDERSSON; NELANDER; ÖHLÉN (2007) e THUNBERG; HASHEMI; ANDERSSON (2008) estudaram a separação de diversos compostos nas fases estacionárias baseadas em polissacarídeos imobilizadas (Chiralpak IA e Chiralpak IB) e adsorvidas fisicamente (Chiralpak AD, Chiralpak AD-H e Chiracel OD-H) no suporte cromatográfico. Nestes trabalhos foi observado que as fases adsorvidas fisicamente apresentaram maior fator de separação e resolução para a maioria dos compostos e os autores atribuíram tal comportamento ao maior número de interações aquirais envolvidas nas fases imobilizadas.

2.7 TERMODINÂMICA DA ENANTIOSEPARAÇÃO

Em cromatografia, a retenção do soluto é expressa pelo fator de retenção, k , determinado pela razão entre a quantidade de moléculas retidas na fase estacionária, n_E , e as que percorrem a coluna na fase móvel, n_M . O fator de retenção também está relacionado à razão dos tempos que as moléculas ficam na fase estacionária, t_R , e na fase móvel, t_M (COLLINS, 2006).

$$k = \frac{n_E}{n_M} = \frac{(t_R - t_M)}{t_M} \quad (2.1)$$

O fator de separação, α , o qual descreve a interação de equilíbrio entre os enantiômeros do soluto e a fase estacionária, a uma temperatura constante, é dado por (CABUSAS, 1998):

$$\alpha = \frac{k_R}{k_S} \quad (2.2)$$

onde k_R e k_S são os fatores de retenção dos enantiômeros mais e menos retido, respectivamente.

No entanto, α também pode ser calculado pela razão entre as constantes de Henry dos enantiômeros mais retido (t_{RR}) e menos retido (t_{RS}) (SCHMIDT-TRAUB, 2005), substituindo-se a equação do fator de retenção (Equação 2.1), na equação do fator de separação (Equação 2.2). O numerador e o denominador da equação resultante devem ser multiplicados pelo termo $\varepsilon_T/(1-\varepsilon_T)$, onde ε_T é a porosidade total da coluna (Equação 2.3).

$$\alpha = \frac{\left(\frac{t_{RR} - t_M}{t_M}\right) \left(\frac{\varepsilon_T}{1 - \varepsilon_T}\right)}{\left(\frac{t_{RS} - t_M}{t_M}\right) \left(\frac{\varepsilon_T}{1 - \varepsilon_T}\right)} = \frac{H_R}{H_S} \quad (2.3)$$

Uma vez que o fator de retenção está diretamente relacionado à constante de equilíbrio (K), tem-se pela relação da energia livre de Gibbs (ΔG^0):

$$\Delta G^0 = -RT \ln K = -RT \ln \left(\frac{k}{\varphi}\right) \quad (2.4)$$

onde R é a constante universal dos gases, T é a temperatura absoluta e φ é a razão de fases ($\varepsilon_T/(1-\varepsilon_T)$).

Os valores de ΔH^0 (variação de entalpia de adsorção) e ΔS^0 (variação de entropia de adsorção), de ambos enantiômeros, são determinados através do gráfico $\ln k$ versus $1/T$, utilizando-se a Equação 2.5 de van't Hoff (WENG et al., 2005).

$$\ln k = \frac{-\Delta H^0}{RT} + \frac{\Delta S^0}{R} + \ln \varphi \quad (2.5)$$

$$\ln k = \frac{-\Delta H^0}{RT} + \Delta S^{0*} \quad (2.6)$$

Considerando $\Delta(\Delta G^0)$ a diferença entre a variação da energia livre de Gibbs da interação dos dois enantiômeros com a fase estacionária quiral,

$$\alpha_{RS} = \exp\left[\frac{-\Delta(\Delta G^0)}{RT}\right] \quad (2.7)$$

A diferença $\Delta(\Delta G^0)$ é responsável somente pela enantioseletividade. Dado que os enantiômeros têm a mesma energia interna, suas entalpias de solvatação são iguais em uma dada fase móvel e, quanto maior o valor de $\Delta(\Delta G^0)$ melhor a separação enantiomérica. Altos valores de ΔG_R^0 e ΔG_S^0 conduzem a um maior tempo de retenção e alargamento das bandas cromatográficas (PIRKLE; POCHAPSKY, 1989).

Aplicando Gibbs-Helmholtz ($\Delta G^0 = \Delta H^0 - T\Delta S^0$) na Equação 2.7 (CABUSAS, 1998):

$$R \ln \alpha_{RS} = \frac{-\Delta(\Delta H^0)}{T} + \Delta(\Delta S^0) \quad (2.8)$$

sendo $\Delta(\Delta H^0)$ e $\Delta(\Delta S^0)$ as diferenças de entalpia e entropia das interações dos enantiômeros R e S com a fase estacionária, respectivamente.

Os valores de $\Delta(\Delta H^0)$ e $\Delta(\Delta S^0)$ podem ser obtidos através da inclinação e interseção do gráfico $R \ln \alpha_{RS}$ versus $1/T$, medindo-se a enantioseletividade, α_{RS} , do par enantiomérico em diferentes temperaturas (CABUSAS, 1998).

A temperatura na qual não há resolução enantiomérica ($\Delta_{RS}(\Delta G^0)=0$) é denominada temperatura isoenantioseletiva (T_{iso}).

$$T_{iso} = \frac{\Delta_{RS}(\Delta H^0)}{\Delta_{RS}(\Delta S^0)} \quad (2.9)$$

Em temperaturas acima da T_{iso} , a ordem de eluição do enantiômero é invertida e a enantioseletividade é controlada por $\Delta_{RS}(\Delta S^0)$. Em temperaturas abaixo da T_{iso} , a enantioseletividade é controlada por $\Delta_{RS}(\Delta H^0)$. Neste caso, um decréscimo na temperatura aumenta a enantioseletividade e, conseqüentemente, a enantioseparação. Quando a enantioseparação é controlada pela entropia, a enantioseletividade decresce com a diminuição da temperatura (SCHURIG, 1994).

2.8 RESOLUÇÃO

Uma outra medida de separação de dois componentes consecutivos é a resolução (R_s). Este parâmetro é calculado a partir da razão entre a distância que separa os pontos máximos das bandas cromatográficas e a média das larguras de suas respectivas bases, w_b , ou das larguras na meia altura, w_h (COLLINS, 2006).

$$R_s = 2 \frac{(t_{RR} - t_{RS})}{w_{bS} + w_{bR}} = 1,177 \frac{(t_{RR} - t_{RS})}{(w_{hS} + w_{hR})} \quad (2.10)$$

Quando $R_s=1$, as duas bandas estão razoavelmente separadas com somente 2% de superposição das mesmas. Maiores valores de resolução indicam melhor separação; onde $R_s=1,25$ é suficiente para fins quantitativos e $R_s>1,5$ indica separação completa (COLLINS, 2006; SCHMIDT-TRAUB, 2005).

A Equação 2.10 pode ser transformada nas Equações 2.11 e 2.12 se a largura das bandas cromatográficas forem equivalentes para ambos enantiômeros (SCHMIDT-TRAUB, 2005).

$$R_{SS} = (\alpha - 1) \left(\frac{k_S}{k_S + 1} \right) \frac{\sqrt{N}}{4} \quad (2.11)$$

$$R_{SR} = \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \left(\frac{k_R}{k_R + 1} \right) \frac{\sqrt{N}}{4} \quad (2.12)$$

onde N é o número de pratos.

A otimização da resolução de um sistema de separação depende de três parâmetros importantes, sendo estes: fator de separação, fator de retenção e número de pratos. Alterações nesses três parâmetros geram mudanças na resolução e, conseqüentemente, na separação dos compostos de interesse (COLLINS, 2006).

2.9 MÉTODO DOS MOMENTOS

A análise dos momentos é utilizada para determinar as constantes de equilíbrio de adsorção e os coeficientes de dispersão axial e de transferência de massa a partir de experimentos de pulsos cromatográficos (ARNOLD; BLANCH; WILKE, 1985a).

Por definição, o n -ésimo momento do perfil do pico cromatográfico, na saída do leito (comprimento L) é dado pela Equação 2.13. O n -ésimo momento absoluto ou normalizado e o n -ésimo momento central são dados pelas Equações 2.14 e 2.15 (GUIOCHON, 2006; GUIOCHON; SHIRAZI; KATTI, 1994; ZUYI; CHANGYIN; QING, 1996).

$$M_n = \int_0^{\infty} C(t, L) t^n dt \quad (2.13)$$

$$\mu_n = \frac{M_n}{M_0} = \frac{\int_0^{\infty} C(t, L) t^n dt}{\int_0^{\infty} C(t, L) dt} \quad (2.14)$$

$$\bar{\mu}_n = \frac{\int_0^{\infty} C(t, L) (t - \mu_1)^n dt}{\int_0^{\infty} C(t, L) dt} \quad (2.15)$$

onde $C(t, L)$ é o perfil de eluição do pico.

O momento zero do perfil de concentração corresponde simplesmente à área da banda cromatográfica. O primeiro momento está relacionado com o tempo de retenção e conseqüentemente à força de adsorção. Coincide com o máximo da banda cromatográfica apenas quando este exibir um formato Gaussiano. O segundo momento corresponde à variância (σ^2) e está relacionado ao alargamento da banda cromatográfica (WANG; CHING, 2002).

O primeiro (μ_1) e o segundo momento ($\bar{\mu}_2$) são dados pelas Equações 2.16 e 2.17 (ARNOLD; BLANCH; WILKE, 1985b; RUTHVEN, 1984), onde L é o comprimento da coluna, u a velocidade superficial da fase móvel, ε a porosidade do leito, ε_p a porosidade da partícula, H a constante de Henry, u_* a velocidade intersticial ($u_* = u/\varepsilon$), D_L e k_m os coeficientes de dispersão axial e de transferência de massa, respectivamente e K é dado pela Equação 2.18 (RUTHVEN, 1984).

$$\mu_1 = t_r = \frac{L}{u_*} \left[1 + \left(\frac{1-\varepsilon}{\varepsilon} \right) \varepsilon_p + \left(\frac{1-\varepsilon}{\varepsilon} \right) (1-\varepsilon_p) H \right] = \frac{L}{u_*} \left[1 + \left(\frac{1-\varepsilon}{\varepsilon} \right) K \right] \quad (2.16)$$

$$\bar{\mu}_2 = \sigma^2 = \frac{2L}{u_*} \left\{ \frac{D_L}{u_*^2} \left[1 + \left(\frac{\varepsilon}{1-\varepsilon} \right) \frac{1}{K} \right]^2 + \left(\frac{\varepsilon}{1-\varepsilon} \right) \frac{1}{K k_m} \right\} \quad (2.17)$$

$$K = \varepsilon_p + (1 - \varepsilon_p)H \quad (2.18)$$

2.10 ALTURA EQUIVALENTE A UM PRATO

A eficiência das condições cromatográficas é medida em termos do número de pratos, a partir dos tempos de retenção obtidos e da largura da base ou largura da banda cromatográfica na meia altura. Um prato corresponde a uma etapa de equilíbrio do soluto entre a fase móvel e a fase estacionária (CASS; DEGANI, 2001). Quanto maior o número de pratos, maior o número de equilíbrios, maior a eficiência da coluna e, conseqüentemente, melhor a separação (COLLINS, 2006). No entanto, efeitos de dispersão axial podem reduzir tal eficiência (WANG; CHING, 2002).

O coeficiente de dispersão axial (D_L) e o coeficiente de transferência de massa (k_m) podem ser calculados a partir da equação da altura equivalente a um prato ($HETP$) (RUTHVEN, 1984).

$$HETP = \frac{L}{N} = \frac{\sigma^2}{\mu^2} L = \frac{2D_L}{u} + 2u \left(\frac{\varepsilon}{1 - \varepsilon} \right) \frac{1}{k_m K} \left[1 + \left(\frac{\varepsilon}{1 - \varepsilon} \right) \frac{1}{K} \right]^{-2} \quad (2.19)$$

$$N = \frac{16d_R^2}{w_b^2} = 5,54 \left(\frac{d_R}{w_h} \right)^2 \quad (2.20)$$

Na Equação 2.20, w_b é a largura da base, w_h é a largura na menor altura e d_R é a distância do ponto máximo da banda cromatográfica (COLLINS, 2006).

A diferença entre as equações encontradas na literatura, da altura equivalente a um prato teórico em função da velocidade superficial da fase móvel, é devido ao uso de diferentes expressões para os coeficientes de dispersão axial e de transferência de massa (DUAN; CHING; SWARUP; 1998).

Os dois principais mecanismos que contribuem para a dispersão axial são a difusão molecular e a difusão turbilhonar. Em uma primeira aproximação, estes efeitos são aditivos e o coeficiente de dispersão é representado pela Equação 2.21 (MIYABE; GUICHON,

2000), onde D_m é a difusividade molecular, γ_1 e γ_2 são parâmetros numéricos e d_p é o diâmetro da partícula.

$$D_L = \gamma_1 D_m + \gamma_2 d_p u \quad (2.21)$$

Pequenos valores de *HETP* indicam elevados valores de *N* e maior eficiência da coluna. Neste caso, uma maior eficiência pode ser alcançada em colunas empacotadas com partículas de pequeno diâmetro e reduzida velocidade de fase móvel, altas temperaturas e fase móvel com baixa viscosidade e moléculas de soluto pequenas (SNYDER; KIRKLAND, 1979).

Estudos detalhados dos processos de transferência de massa que ocorrem em uma coluna cromatográfica, tais como dispersão axial, transferência de massa do fluido para a partícula, difusão no interior das partículas e cinética de adsorção/dessorção, fornecem informações relevantes sobre os mecanismos de separação (MIYABE; GUIOCHON, 2000).

Em separações cromatográficas, a relação entre a altura equivalente a um prato e a velocidade superficial da fase móvel é dada pela equação de van Deemter (ARNOLD; BLANCH; WILKE, 1985b; GUIOCHON, 2002):

$$HETP = A + \frac{B}{u} + Cu \quad (2.22)$$

onde *A*, *B* e *C* são constantes cinéticas determinadas experimentalmente. *A* e *B* representam, respectivamente, os efeitos de dispersão axial e difusão molecular na direção axial e *C* representa as contribuições de transferência de massa no filme estagnado que circunda o adsorvente, difusão dentro da partícula e baixa cinética de sorção.

Em sistemas líquidos, a contribuição da difusão molecular, para a dispersão axial, é relativamente pequena e, muitas vezes, perceptível apenas em baixas vazões de fase

móvel. Neste caso, obtém-se uma equação de van Deemter modificada (Equação 2.23) (DUAN; CHING; SWARUP, 1998; MIYABE; GUICHON, 1999, 2000).

$$HETP = A + Cu \quad (2.23)$$

$$A = 2\gamma_2 d_p \quad (2.24)$$

$$C = 2 \left(\frac{\varepsilon}{1-\varepsilon} \right) \frac{1}{Kk_m} \left[1 + \left(\frac{\varepsilon}{1-\varepsilon} \right) \frac{1}{K} \right]^{-2} \quad (2.25)$$

A Figura 2.7 mostra a altura equivalente a um prato em função da velocidade superficial da fase móvel de acordo com a equação de van Deemter.

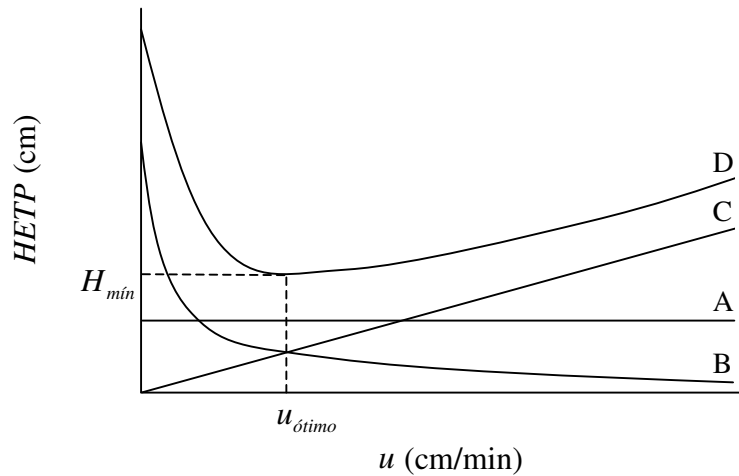


Figura 2.7: Variação da altura equivalente a um prato em função da velocidade superficial da fase móvel de acordo com a equação de van Deemter (KRIJGSMAN, 1992).

A primeira curva é constante e independente da velocidade superficial, a segunda é inversamente proporcional e a terceira é uma função linear. A curva D representa o perfil resultante da altura equivalente a um prato em função da velocidade superficial da fase móvel e exibe um valor mínimo ($HETP_{m\acute{i}n}$) em uma velocidade superficial ótima ($u_{\acute{o}timo}$) (KRIJGSMAN, 1992). Em velocidades inferiores e superiores a $u_{\acute{o}timo}$, $HETP$ é dependente da difusão (termo B) e da transferência de massa (termo C) (SEWELL; CLARKE, 1987).

2.11 ISOTERMAS DE ADSORÇÃO

Nos processos de separação por cromatografia, o comportamento no equilíbrio das espécies adsorvidas na fase estacionária é avaliado pela sua isoterma de adsorção que representa todas as forças de interações possíveis, atração ou repulsão, entre as moléculas do soluto e a fase estacionária (CAVAZZINI et al., 2001).

O problema direto da cromatografia consiste no cálculo dos perfis de eluição dos componentes através de suas isotermas de adsorção. O problema inverso consiste na derivação da isoterma a partir dos perfis de eluição. Neste último caso, os dados de equilíbrio são obtidos de uma série de medidas cromatográficas nas quais as concentrações dos componentes são sistematicamente ajustadas (FELINGER; CAVAZZINI; GUIOCHON, 2003).

As condições ótimas de operação e desenvolvimento de uma separação em CLAE podem ser determinadas a partir de cálculos computacionais. No entanto, estes cálculos requerem um conhecimento prévio sobre a cinética e a termodinâmica dos processos cromatográficos. A cinética é caracterizada pela transferência de massa na coluna e a termodinâmica pelas isotermas dos componentes da alimentação (GRITTI; GUIOCHON, 2003).

A otimização computacional e o *scale-up* do processo de separação, de misturas binárias ou multicomponentes, em adsorventes quírais, é uma tarefa complexa que requer, em escala preparativa, a seleção das condições de operação. Por isso, a determinação das isotermas de adsorção dos componentes da alimentação é extremamente relevante no estudo de um processo de separação cromatográfico. O conhecimento das isotermas contribui para explicar o mecanismo de retenção e prever a taxa de produção e os custos de separação (ARAÚJO; RODRIGUES; MOTA, 2008; ARNELL; FÓRSSÉN; FORNSTEDT, 2005; FELINGER; ZHOU; GUIOCHON, 2003; RIBEIRO et al., 2008; ZHOU; KACZMARSKI; GUIOCHON, 2003).

De acordo com GRITTI; GUIOCHON (2005), alguns testes devem ser sucessivamente aplicados para encontrar o modelo de isoterma que melhor representa os dados experimentais. O processo de seleção reduz, por eliminação, a quantidade de modelos que descrevem determinado sistema.

O primeiro teste consiste em plotar o gráfico de Scatchard (q/c versus q), onde os modelos de isotermas podem ser classificados de acordo com a forma do gráfico obtido. Por exemplo, gráficos de Scatchard convexos para baixo representam os modelos de bi-Langmuir, Langmuir-Freundlich e Tóth e gráficos convexos para cima representam os modelos de Jovanovic e Fowler. Apenas o modelo de Langmuir apresenta um gráfico de Scatchard linear. Modelos de isotermas com um ponto de inflexão (MIHLBACHLER et al., 2002b, 2006) apresentam ponto de mínimo e/ou máximo no gráfico.

O segundo teste envolve a correlação dos modelos de isotermas selecionados aos dados de equilíbrio, através da análise de regressão utilizando o algoritmo Marquardt, o qual minimiza a soma dos quadrados dos resíduos da diferença entre os dados experimentais e os dados calculados com o modelo. Em seguida, o parâmetro Fischer é calculado para selecionar os melhores modelos e o teste F utilizado para avaliar estatisticamente qual modelo melhor representa os dados experimentais.

O terceiro teste compara os modelos de isotermas remanescentes com os resultados do cálculo da distribuição da energia de adsorção, a qual mostra se a distribuição é unimodal (Langmuir e Tóth) ou multimodal (bi-Langmuir).

Se após a terceira etapa ainda existir mais de um modelo que represente os dados experimentais, deve ser feita uma comparação entre os perfis de eluição, calculados e experimentais, em baixas e altas concentrações. No entanto, se nenhuma diferença significativa for encontrada entre estes modelos, a escolha final deverá ser baseada no significado físico dos parâmetros das isotermas.

2.11.1 Modelo de Langmuir

É o modelo mais comumente utilizado para analisar isotermas de equilíbrio não-lineares (FORNSTEDT et al., 1999; JAMES et al., 1999). As vantagens do modelo, expresso pela Equação 2.26 (CAVAZZINI; FELINGER; GUICHON, 2003; FELINGER; GRITTI; GUICHON, 2004; LAI; LIN, 1999; SAMUELSSON et al., 2008, SUN et al., 2001), são a simplicidade de dedução e o reduzido número de parâmetros para descrever a adsorção competitiva: capacidade de saturação e duas constantes de equilíbrio (CAVAZZINI et al., 2002).

$$q_i = \frac{a_i c_i}{1 + b_i c_i} = \frac{b_i q_s c_i}{1 + b_i c_i} \quad (2.26)$$

onde, b_i é a constante de equilíbrio de adsorção, relacionada a energia de adsorção, q_s ($= a_i/b_i$) é a capacidade de saturação do adsorvente e a_i ($= q_s b_i$) é o coeficiente de distribuição, também chamado de constante de Henry em baixas concentrações de soluto ($a_i = H_{0,i} = dq_i/dc_i|_{c \rightarrow 0}$).

2.11.2 Determinação das isothermas de adsorção

2.11.2.1 Métodos estáticos

Os métodos estáticos, batelada e adsorção-dessorção, não analisam as curvas de concentração em função do tempo e utilizam apenas informações do estado de equilíbrio. Apresentam como desvantagens demasiado tempo de análise e grandes quantidades de soluto e adsorvente (SEIDEL-MORGENSTERN, 2004).

2.11.2.2 Métodos dinâmicos

Os métodos dinâmicos fundamentam-se na análise matemática da curva de resposta referente às variações de concentração na entrada da coluna (SEIDEL-MORGENSTERN, 2004). Análise Frontal (AF) ou método do balanço de massa, Análise Frontal por Pontos Característicos (AFPC), Eluição por Pontos Característicos (EPC), Método da Perturbação (MP) e Método Inverso (MI) são métodos dinâmicos utilizados na determinação de isothermas (JAMES et al., 1999; ZHOU; KACZMARSKI; GUIOCHON, 2003).

Análise frontal

É o método mais comumente utilizado devido a sua precisão e simplicidade (FELINGER; ZHOU; GUIOCHON, 2003; MIHLBACHLER et al., 2002b). No entanto,

apresenta como desvantagens o demasiado tempo de análise e o elevado consumo de soluto e solvente (ARNELL; FORSSÉN; FORNSTEDT; 2005; BURGER et al., 2000; KACZMARSKI, 2007; SUN et al., 2001). O método refere-se à determinação de isotermas a partir das curvas de ruptura (SEIDEL-MORGENSTERN, 2004). Pode ser realizado pelo método do pulso ou pelo método de degraus consecutivos (BURGER et al., 2000; SUN et al., 2001).

No primeiro método, a coluna inicialmente em equilíbrio com a fase móvel, é alimentada com uma solução de concentração conhecida contendo o soluto, até a sua saturação. Em seguida, a coluna é alimentada apenas com a fase móvel, o soluto é removido e o equilíbrio novamente atingido. A massa adsorvida em cada curva de ruptura é calculada independentemente das outras curvas, o que elimina o acúmulo de erros. O processo é repetido inúmeras vezes dando origem a novas curvas de ruptura. Cada curva gera um ponto na isoterma de adsorção (BURGER et al., 2000; GRITTI; GUIOCHON, 2003; GUIOCHON; SHIRAZI; KATTI, 1994; JACOBSON; FRENZ; HORVÁTH, 1987; SUN et al., 2001).

O segundo modo de injeção consiste no aumento da concentração da solução contendo o soluto, em intervalos de tempo apropriados, até a saturação da coluna. A composição do soluto em cada platô é determinada da análise do eluente em um segundo sistema cromatográfico. Neste método, não há regeneração da coluna entre duas etapas consecutivas e os erros são propagados de etapa para etapa, uma vez que, a massa adsorvida na etapa $i+1$, depende do valor da massa adsorvida na etapa anterior, i (BURGER et al., 2000; GRITTI; GUIOCHON, 2005; SUN et al., 2001).

Os perfis de concentração, de um único componente e de uma mistura binária, obtidos pelo método da análise frontal em um único degrau são apresentados nas Figuras 2.8 e 2.9.

Na Figura 2.8, as áreas A_1 e A_2 representam a massa de soluto na fase móvel fora e dentro da coluna cromatográfica, respectivamente. O volume referente à área A_1 é denominado volume morto do sistema, V_M , e o volume referente à área A_2 volume morto da coluna, V_0 ($V_0 = V_c \varepsilon_T$). A área A_3 representa a massa de soluto adsorvida na fase estacionária e a área A_4 corresponde à massa de soluto que sai da coluna durante o tempo

do experimento (GRITTI; GUIOCHON, 2003, 2005; LAI; LIN, 1999; SAMUELSSON et al., 2008).

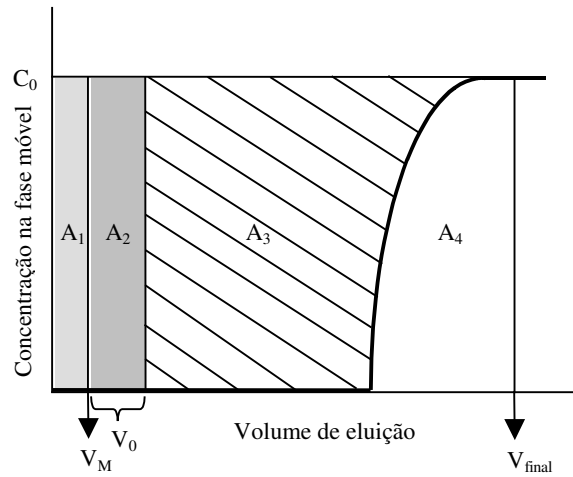


Figura 2.8: Perfil de eluição de um único componente obtido pelo método da análise frontal (Adaptado de GRITTI; GUIOCHON, 2005).

Consequentemente, a concentração de soluto adsorvido na fase estacionária (q_i) em equilíbrio com uma dada concentração de soluto na fase móvel (c_i) é dada pela Equação 2.27 (CAVAZZINI; FELINGER; GUIOCHON, 2003; CHERRAK; KHATTABI; GUIOCHON, 2000; GRITTI; GUIOCHON, 2003, 2005; PIATKOWSKI et al., 2003):

$$q_i = \frac{A_3}{V_c - V_0} = \frac{c_i(V_1 - V_T)}{V_a} \quad (2.27)$$

onde, V_c é o volume da coluna, V_1 é o volume de retenção do ponto de inflexão da curva de ruptura, V_T é o volume morto total, volume morto do sistema mais o volume morto da coluna, e V_a é o volume de adsorvente.

Segundo SAMUELSSON et al. (2008), todos os métodos de determinação do volume morto da coluna contêm fontes de erros e por isso o valor obtido será diferente dependendo do método utilizado. GRITTI; GUIOCHON (2005) encontraram uma diferença

de 14%, entre o composto não retido (tiouréia) e o método de picnometria, na determinação do volume. SAJONZ (2004) mostrou que um erro no cálculo do volume morto resulta em sérios erros nos coeficientes das isothermas de adsorção, as quais são mais sensíveis ao erro quando em altas concentrações.

SAMUELSSON; SAJONZ; FORNSTEDT (2008) avaliaram o impacto do erro no cálculo do volume morto da coluna na determinação de isothermas de adsorção. Os resultados mostraram que quando se utilizou o volume morto correto, os modelos de Langmuir e bi-Langmuir foram correlacionados aos dados de equilíbrio. Quando o volume morto utilizado foi super e subestimado, o modelo de Tóth (heterogêneo) e o modelo de Moreau (adsorção multicamadas ou interações soluto-soluto) foram melhores correlacionados aos dados de equilíbrio.

A curva de ruptura para uma mistura binária exibe um platô intermediário na etapa de adsorção e dessorção, cuja largura diminui com o aumento da concentração dos dois componentes na fase móvel (SUN et al., 2001; BURGER et al., 2000).

Na Figura 2.9, considerando apenas a etapa de adsorção, em $t < 0$, a coluna é inicialmente condicionada com uma solução na qual a concentração dos componentes 1 e 2 são $c_{1,a}$ e $c_{2,a}$, respectivamente. Em $t = 0$ essas concentrações são alteradas para $c_{1,b}$ e $c_{2,b}$ promovendo a elevação de duas frentes com volumes de retenção iguais a $V_{1,ads}$ e V_2 , os quais são determinados do ponto de inflexão da curva de ruptura. As concentrações dos componentes no platô intermediário, formado entre as duas frentes na etapa de adsorção, são $c_{1,pi}$ e $c_{2,pi}$. Apenas o enantiômero menos retido é eluído nesse platô na etapa de adsorção. Na etapa de dessorção, o platô intermediário é referente ao enantiômero mais retido (MIHLBACHLER et al., 2002b). O segundo platô é composto pelos dois enantiômeros e suas concentrações são iguais à da amostra injetada (JACOBSON; FRENZ; HORVÁTH, 1987).

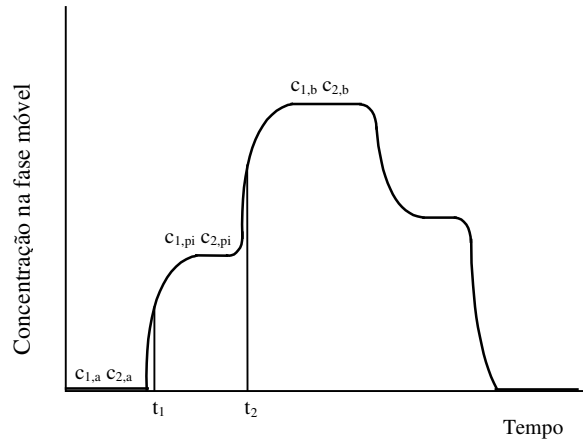


Figura 2.9: Perfil de eluição de uma mistura binária obtido pelo método da análise frontal (Adaptado de LAI; LIN, 1999).

Os dados experimentais para a determinação das isotermas de adsorção podem ser obtidos da etapa de adsorção ou dessorção da curva de ruptura, segundo as Equações 2.28 e 2.29. A concentração de cada componente adsorvido na superfície do adsorvente é determinada do volume de retenção das duas frentes da curva e da composição de cada componente nos platôs intermediários (CHERRAK; KHATTABI; GUIOCHON, 2000; JACOBSON; FRENZ; HORVÁTH, 1987; MIHLBACHLER et al., 2002b).

$$q_i = \frac{(V_2 - V_0)(c_{i,b} - c_{i,a}) - (V_2 - V_{1,ads})(c_{i,pi} - c_{i,a})}{V_a} \quad (2.28)$$

$$q_i = \frac{(V_2 - V_0)(c_{i,b} - c_{i,a}) - (V_2 - V_{1,des})(c_{i,pi} - c_{i,a})}{V_a} \quad (2.29)$$

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

Todos os métodos (AF, AFPC, EPC, MP e MI) são utilizados na obtenção de isotermas de um único componente. No entanto, apenas AF, MP e MI determinam isotermas competitivas (JAMES et al., 1999).

2.12 MODELAGEM MATEMÁTICA DO PROCESSO CROMATOGRÁFICO

Os fenômenos físico-químicos envolvidos nos processos cromatográficos são a termodinâmica de adsorção, a resistência à transferência de massa e a hidrodinâmica da coluna (GUIOCHON; LIN, 2003). Estes fenômenos podem ser descritos por modelos matemáticos desenvolvidos a partir de equações de balanço de massa (KACZAMARSKI, 2007; SCHMIDT-TRAUB, 2005).

A complexidade destes modelos aumenta com o número de parâmetros (fenômenos abordados). No entanto, os mais complexos nem sempre são os que proporcionam a melhor correlação entre o perfil calculado e o perfil experimental (ZHOU et al., 2003).

O modelo ideal, o mais simples dos modelos, assume equilíbrio instantâneo entre as fases líquida e sólida e eficiência infinita da coluna, negligenciando assim os efeitos de dispersão axial e de resistência à transferência de massa. O balanço de massa do componente i é dado por (MIHLBACHLER et al., 2001; MIHLBACHLER et al., 2002a):

$$\frac{\partial c_i}{\partial t} + u \frac{\partial c_i}{\partial z} + \left(\frac{1 - \varepsilon_T}{\varepsilon_T} \right) \frac{\partial q_i}{\partial t} = 0 \quad (2.30)$$

Em sistemas não-ideais, sistemas onde os efeitos hidrodinâmicos e de transferência de massa são considerados, os modelos mais comumente utilizados são: o modelo geral (MG), o modelo do transporte-dispersivo (MTD) e o modelo do equilíbrio-dispersivo (MED). Entre eles, o mais simples é o modelo do equilíbrio-dispersivo (ZHOU et al., 2003).

O modelo do equilíbrio-dispersivo também assume um equilíbrio instantâneo entre a fase líquida e sólida, mas considera os efeitos de eficiência finita da coluna. Os fenômenos que favorecem o alargamento dos picos, dispersão axial e resistência à

transferência de massa, são descritos por um coeficiente de dispersão aparente (CHERRAK; KHATTABI; GUIOCHON, 2000; FELINGER; CAVAZZINI; GUIOCHON, 2003; FELINGER; GRITTI; GUIOCHON, 2004; MIHLBACHLER et al., 2002a; MIHLBACHLER et al., 2002b). Este modelo é comumente utilizado quando o número de pratos teóricos da coluna é superior a 1000. Neste caso, o comportamento não linear da isoterma de equilíbrio exerce uma maior influência sobre o perfil de eluição do que a cinética de transferência de massa (CHERRAK; KHATTABI; GUIOCHON, 2000).

A Equação 2.31 representa a equação do balanço de massa para cada componente da amostra.

$$\frac{\partial C_i}{\partial t} + \left(\frac{1 - \varepsilon_T}{\varepsilon_T} \right) \frac{\partial q_i}{\partial t} + u \frac{\partial C_i}{\partial z} = D_a \frac{\partial^2 C_i}{\partial z^2} \quad (2.31)$$

onde D_a é o coeficiente de dispersão aparente $\left(D_a = \frac{uL}{2N} \right)$.

$$t = 0 \quad C_i = 0 \text{ e } q_i = 0$$

$$z = 0 \quad \left. \frac{\partial C_i}{\partial z} \right|_{z=0} = \frac{u}{D_a} (C_i|_{z=0} - C_f(t))$$

$$z = L \quad \left. \frac{\partial C_i}{\partial z} \right|_{z=L} = 0$$

2.13 INFLUÊNCIA DA POROSIDADE TOTAL DO LEITO NA CROMATOGRAFIA PREPARATIVA EM BATELADA

A cromatografia preparativa em batelada é o método comumente utilizado quando pequenas quantidades de enantiômeros puros são requeridas para a realização de testes farmacológicos (NICOUD et al., 1993).

A otimização do processo está relacionada ao método de fracionamento ou estratégia de corte das bandas cromatográficas (Figura 2.10) (SCHMIDT-TRAUB, 2005).

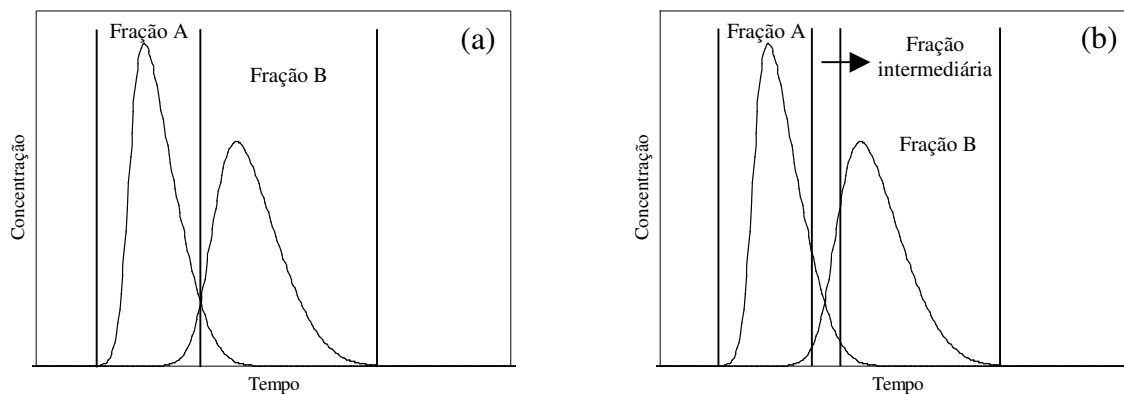


Figura 2.10: Métodos de fracionamento para uma mistura binária (Adaptado de SCHMIDT-TRAUB, 2005).

No primeiro método (a) os enantiômeros são coletados consecutivamente e uma elevada pureza só é obtida reduzindo-se a concentração ou o volume da alimentação. No segundo método (b) três frações são coletadas na saída da coluna: a primeira corresponde ao enantiômero menos retido, a segunda corresponde a região intermediária dos enantiômeros e a terceira corresponde ao enantiômero mais retido (GRILL, MILLER, YAN, 2004). A segunda fração pode ser descartada, reciclada ou submetida a um outro método de purificação, e sua presença não aumenta a complexidade da otimização uma vez que os tempos de coleta (início e término) podem ser definidos fixando-se a pureza desejada. Neste caso, pode-se alcançar uma elevada pureza reduzindo-se a concentração ou o volume da alimentação ou aumentando-se o tempo de coleta da segunda fração (SCHMIDT-TRAUB, 2005).

No entanto, embora a pureza sirva como uma restrição para o problema associado ao tempo de coleta, nos dois métodos de fracionamento, a recuperação do processo é influenciada pelas variações de porosidade, uma vez que esta é calculada a partir do perfil de concentração e este é obtido da resolução numérica da Equação 2.31, que tem como dados de entrada a porosidade total, as constantes de Henry e os parâmetros das isothermas.

De acordo com a revisão da literatura, a síntese de substâncias opticamente puras e a separação de enantiômeros com elevado grau de pureza enantiomérica é uma importante tarefa das indústrias químicas e farmacêuticas modernas, as quais têm intensificado o desenvolvimento de novas tecnologias devido à disponibilidade de eficientes técnicas de separação, como a cromatografia líquida de alta eficiência com emprego de fases estacionárias quirais.

O crescente interesse nesse processo está relacionado à síntese e oferta de novos adsorventes quirais comerciais. Os fatores levados em consideração no desenvolvimento ou utilização de uma determinada fase quiral em separações preparativas são: grande disponibilidade, custos relativamente baixos, ampla aplicação, durabilidade (estabilidade mecânica e química), elevada capacidade de adsorção e enantioseletividade.

CAPÍTULO 3

MATERIAIS E MÉTODOS

Neste capítulo são descritos os materiais e a metodologia utilizada nos experimentos.

3.1 MATERIAIS

A mistura racêmica do fármaco omeprazol foi doada pela Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda (Itapira, São Paulo).

Os materiais e solventes utilizados na preparação das colunas e nas análises cromatográficas foram:

- Amilose de batata tipo III (Sigma-Aldrich, EUA);
- Bisulfito de sódio (Synth, Brasil);
- Cloreto de cálcio anidro (Synth, Brasil);
- Colunas de aço inoxidável (Phenomenex, EUA);
- 3,5-dimetilfenil isocianato (Acros, EUA);
- Hexano (J.T. Baker, EUA);
- Hidreto de cálcio (Aldrich, EUA);
- Hidróxido de potássio (Qhemis, BRASIL);
- Isopropanol (J.T. Baker, EUA);
- Metanol (J.T. Baker, EUA);
- N,N-dimetilacetamida (Aldrich, EUA);
- Pentóxido de fósforo (Vetec, BRASIL);
- Piridina (J.T. Baker, EUA);
- Sílica Luna NH₂ (100 Å e 9 µm) (Phenomenex, EUA)

- Tetrahidrofurano (THF) (Synth, Brasil);
- 1,3,5-tri-*terc*-butilbenzeno (TTBB) (Aldrich, EUA).

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Preparação das colunas cromatográficas

A colunas cromatográficas, contendo a FEQ tris(3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose, adsorvida fisicamente em partículas de sílica Luna NH₂, foram confeccionadas de acordo com a metodologia descrita por MATLIN et al., 1994.

As principais etapas envolvidas no processo são: derivação da amilose, recobrimento do suporte de sílica pelo carbamato e empacotamento.

A síntese e a caracterização do derivado de polissacarídeo, por análise elementar e espectroscopia na região do infravermelho, e o recobrimento do suporte cromatográfico foram realizados no Laboratório de Síntese Orgânica e CLAE, do Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos, sob a orientação da Profa. Dra. Quezia Bezerra Cass.

O empacotamento das colunas e os experimentos foram realizados no Laboratório de Biosseparação, da Faculdade de Engenharia Química, da Universidade Estadual de Campinas.

3.2.1.1 Síntese do derivado de polissacarídeo

Partiu-se de 1,572 (\pm 0,001) g de carboidrato (amilose) previamente seco em estufa a vácuo a 60 (\pm 1,0) °C/24 h. Adicionou-se 60 mL de piridina anidra, previamente tratada com hidróxido de potássio (KOH), destilada e armazenada em frasco âmbar contendo peneira molecular. A mistura reacional foi aquecida a 100 (\pm 1,0) °C/24 h sob agitação magnética. Após resfriamento a temperatura ambiente, 5,0 g do reagente 3,5-dimetilfenil isocianato foi adicionado à mistura, a qual permaneceu em refluxo a 100 (\pm 1,0) °C/72 h. Decorrido o tempo, a mistura foi novamente resfriada a temperatura ambiente, o produto precipitado em 300 mL de metanol sob agitação magnética por 1 h, filtrado a

vácuo em funil de placa sinterizada e lavado repetidas vezes com metanol, para total eliminação da piridina.

Em seguida o derivado de polissacarídeo foi seco em dessecador com pentóxido de fósforo (P_2O_5) e caracterizado por espectroscopia na região do infravermelho (IV) e análise elementar (CHN) (CASS; BASSI; MATLIN, 1999).

Os espectros na região do infravermelho foram registrados em um espectrofotômetro Bomem-Hartmann & Braun, modelo MB-102 e a análise elementar utilizou um equipamento Fisons EA 1108.

3.2.1.2 Recobrimento do suporte de sílica pelo carbamato

Uma suspensão de THF (30 mL) e sílica Luna NH_2 ($3,334 \pm 0,001$ g) foi mantida sob refluxo durante 30 minutos. Após resfriamento a temperatura ambiente, adicionou-se em pequenas proporções $0,834 (\pm 0,001)$ g do carbamato de amilose previamente solubilizado em THF e N,N-dimetilacetamida (DMA) (9:1 v/v). Em seguida os solventes foram evaporados em banho de gelo com o auxílio de rotaevaporadores Buchi, modelos R-114 e R-200. O resultado final foi uma cobertura de 20% g/g de carbamato em relação à sílica.

Em seguida, a fase estacionária foi totalmente seca em bomba a vácuo e o tamanho de suas partículas uniformizadas e homogeneizadas em peneira de orifício 38 μm , adquirida da Bertel Indústria Metalúrgica Ltda.

As partículas de sílica e a FEQ foram analisadas por técnicas de espalhamento de laser e microscopia eletrônica de varredura (MEV), no Laboratório de Recursos Analíticos e de Calibração, da Faculdade de Engenharia Química da Universidade Estadual de Campinas.

As análises por espalhamento de *laser* foram realizadas em equipamento Mastersizer S, marca Malvern, modelo S-MAM 5005 e faixa de operação 0,05-900 μm . O recobrimento do carbamato sobre a superfície das partículas de sílica e a esfericidade e uniformidade das mesmas foram analisadas por um microscópio eletrônico de varredura, marca Leo e modelo Leo 440i.

3.2.1.3 Empacotamento das colunas cromatográficas

Foram confeccionadas duas colunas analíticas, A15 (15 x 0,46 cm D.I.) e A25 (25 x 0,46 cm D.I.), e nove colunas semipreparativas, SP (25 x 1,0 cm D.I.), contendo a FEQ tris(3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose.

Para o empacotamento das colunas cromatográficas, foi preparada uma suspensão contendo aproximadamente 3,5 ($\pm 0,0001$) g da fase estacionária quiral e 50 mL de hexano:isopropanol (50:50 v/v). A suspensão foi colocada em banho ultra-som por três minutos e adicionada à coluna A25 sob pressão de 7500 psi (bomba Haskel), utilizando-se como fase móvel a mesma mistura de solventes acima, porém em proporções diferentes (90:10 v/v) (CASS; BASSI; MATLIN, 1999).

As mesmas condições experimentais foram utilizadas no empacotamento das colunas A15 e SP. No entanto, as quantidades em massa de FEQ e em volume de hexano:isopropanol (50:50 v/v) foram aproximadamente 2,1 e 17,0 ($\pm 0,0001$) g e 50 e 100 mL, respectivamente.

Após o empacotamento, as colunas A15, A25 e SP foram condicionadas por 12 e 24 horas, respectivamente, em hexano:isopropanol (95:05 v/v), a uma vazão de 0,5 mL/min.

A coluna A25 foi preparada com o propósito de testar o comportamento da sílica Luna NH₂ como suporte cromatográfico na resolução dos enantiômeros do omeprazol. As demais colunas foram empacotadas com material proveniente da mistura dos carbamatos e da FEQ, obtidos ao fim das etapas de síntese e recobrimento do suporte. Estas etapas foram realizadas em batelada, devido ao elevado custo dos reagentes e à necessidade de se obter aproximadamente 160 g da FEQ dado o número de colunas.

3.2.2 Experimentos preliminares

Todas as análises cromatográficas foram realizadas em um cromatógrafo líquido de alta eficiência (Waters, modelo 2487), composto por duas bombas (modelo 1525) e detector de absorvância no ultravioleta-visível (UV-vis). Os perfis de eluição foram registrados pelo software Breeze.

3.2.2.1 Definição do modo de eluição

As fases móveis foram preparadas na relação volume/volume e degaseificadas em ultra-som (Cole-Parmer, modelo 8892R-MT) e bomba de vácuo (Primar, modelo 141).

A coluna e as condições cromatográficas utilizadas na definição da FM foram: A25; T = 25 °C; FM = hexano:etanol (70:30 v/v) e metanol (100%); $V_{\text{injeção}} = 20 \mu\text{L}$; Q = 1,0 mL/min; $\lambda = 302 \text{ nm}$.

3.2.2.2 Avaliação da ordem de eluição do par enantiomérico e do sentido da rotação da luz circularmente polarizada

A ordem de eluição dos enantiômeros do omeprazol foi determinada utilizando-se o sistema de CLAE citado acima, a coluna cromatográfica SP1 e as seguintes condições experimentais: $C_{\text{mistura racêmica}} = 0,1 \text{ mg/mL}$; $C_{S(-)\text{-omeprazol}} = 0,2 \text{ mg/mL}$; T = 25 °C; FM = metanol (100%); $V_{\text{injeção}} = 20 \mu\text{L}$; Q = 3,0 mL/min e $\lambda = 302 \text{ nm}$.

O sentido de rotação da luz circularmente polarizada, pelos enantiômeros do omeprazol, foi analisado por um detector baseado em dicroísmo circular (modelo CD-2095 Plus, Jasco) e os dados registrados pelo software CLASS-VP. A coluna cromatográfica e as condições experimentais utilizadas foram: SP9; C = 0,1 mg/mL; T = 25 °C; FM = metanol (100%); $V_{\text{injeção}} = 20 \mu\text{L}$; Q = 3,0 mL/min e $\lambda = 302 \text{ nm}$.

3.2.3 Avaliação das porosidades

A homogeneidade do empacotamento das colunas cromatográficas foi avaliada pela porosidade total, a qual foi determinada por experimentos de pulsos cromatográficos com um composto não retido pela fase estacionária, o 1,3,5-tri-*terc*-butilbenzeno.

Injeções de 20 μL do composto, concentração 3,0 mg/mL, foram realizadas nas colunas SP1, SP5 e SP7, em diferentes temperaturas (25, 30, 40 e 50 °C (SP1); 25, 35, 40 e 50 °C (SP5) e 25, 35 e 45°C (SP7)) e vazões da FM (1,0, 2,0, 3,0 e 4,0 mL/min). Nas colunas SP1 e SP5 os experimentos foram realizados em duplicata e nas demais colunas em triplicata. As respostas dos pulsos cromatográficos foram monitoradas no comprimento de

onda igual a 254 nm. O mesmo procedimento foi utilizado na determinação da porosidade total das demais colunas. No entanto, apenas a temperatura de 25 °C foi analisada.

Os valores de ε_T foram obtidos de acordo com a Equação 3.1.

O tempo que um pulso leva para percorrer a coluna é diretamente proporcional à sua porosidade (KOSTOVA; BART, 2007; PEDEFERRI et al., 1999).

$$\varepsilon_T = \frac{V_L}{V_C} = \frac{t_M \cdot Q}{V_C} \quad (3.1)$$

onde ε_T é a porosidade total da coluna, a fração de vazios referente aos poros do adsorvente e aos espaços entre as partículas; t_M , o tempo de retenção do componente não-retido; Q , a vazão da fase móvel; V_L , o volume de líquido e V_C , o volume da coluna.

No entanto, t_M na Equação 3.1 corresponde ao tempo gasto pelo componente não-retido para percorrer somente a coluna cromatográfica. Neste caso, o tempo de retenção na ausência da coluna foi subtraído do tempo total de retenção de acordo com a Equação 3.2.

$$t_M = t_{total} - t_{V_0} \quad (3.2)$$

onde t_{total} é o tempo total de retenção e t_{V_0} é o tempo de retenção no volume morto que considera as tubulações e conexões do sistema de análise na ausência da coluna.

A porosidade da partícula foi calculada a partir dos valores de densidade do sólido e do volume total de poros. A densidade foi determinada pelo método de picnometria a gás e o volume total de poros pela técnica de adsorção de nitrogênio à 77 K.

A primeira análise foi realizada no Laboratório de Calibração e Planta Piloto do DTF/FEQ/Unicamp e utilizou um picnômetro Accupy (Micromeritics, modelo 1330, EUA). A segunda análise foi realizada no Laboratório de Recursos Analíticos e de Calibração/FEQ/Unicamp e utilizou o equipamento ASAP (Micromeritics, modelo 2010, EUA).

A porosidade do leito foi obtida utilizando-se a Equação 3.3.

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

3.2.4 Avaliação dos coeficientes de dispersão axial e de transferência de massa

Injeções de 20 μL da mistura racêmica, concentração de 0,1 mg/mL, foram realizadas na coluna SP1, em diferentes temperaturas (25, 30, 40 e 50 $^{\circ}\text{C}$) e vazões da FM (1,0, 2,0, 3,0 e 4,0 mL/min). O comprimento de onda utilizado foi 302 nm. O mesmo procedimento foi adotado nas colunas SP5 e SP7. No entanto, as temperaturas avaliadas na coluna SP5 foram 25, 35, 40 e 50 $^{\circ}\text{C}$ e na coluna SP7 25, 35 e 45 $^{\circ}\text{C}$. Nas demais colunas apenas a temperatura de 25 $^{\circ}\text{C}$ foi avaliada.

O número de pratos (N) foi calculado pelo software Breeze e a altura equivalente a um prato ($HETP$) foi obtida da Equação 2.19. Os coeficientes de dispersão axial (D_L) e de transferência de massa global (k_m) foram determinados do gráfico $HETP$ versus u de acordo com a Equação 2.23.

3.2.5 Avaliação do comportamento termodinâmico da adsorção

3.2.5.1 Constantes de Henry

As constantes de Henry foram determinadas utilizando-se a Equação 3.4 (KOSTOVA; BART, 2007; PEDEFERRI et al., 1999).

$$H = \left(\frac{t_R - t_M}{t_M} \right) \frac{\varepsilon_T}{1 - \varepsilon_T} = \frac{k}{\varphi} \quad (3.4)$$

3.2.5.2 Influência da temperatura

A resolução (R_s), assim como os fatores de separação (α) e retenção (k), foram avaliados em função da temperatura e vazão da FM e calculados pelo software do equipamento.

Os parâmetros termodinâmicos, ΔH^0 (variação de entalpia) e ΔS^0 (variação de entropia), foram determinados através da inclinação e interseção do gráfico $\ln k$ versus $1/T$ (Equação 2.5). $\Delta(\Delta H^0)$ e $\Delta(\Delta S^0)$ foram obtidos do gráfico $\ln \alpha$ versus $1/T$ (Equação 2.8).

3.2.5.3 Influência da concentração de soluto

As isotermas de adsorção dos enantiômeros do omeprazol foram determinadas a partir das curvas de ruptura obtidas com soluções da mistura racêmica de concentrações iguais a 1,0; 2,0; 3,0 e 4,0 mg/mL na coluna SP6.

As condições cromatográficas utilizadas nos experimentos, como o comprimento de onda, temperatura e vazão da fase móvel, foram 350 nm, 25 °C e 2,0 mL/min, respectivamente. Devido à extrapolação do limite de detecção do sistema cromatográfico, o comprimento de onda foi alterado de 302 nm para 350 nm.

Primeiramente a coluna foi condicionada apenas com a fase móvel, a uma vazão constante, até a estabilização da linha de base. Em seguida, a solução de concentração conhecida contendo a mistura racêmica foi injetada continuamente no sistema cromatográfico até a saturação da coluna (etapa de adsorção). Após o equilíbrio ser atingido, a mistura foi removida da coluna pela injeção de fase móvel (etapa de dessorção).

Os dados experimentais de equilíbrio foram obtidos da frente de adsorção de cada curva de ruptura de acordo com a Equação 2.28 e correlacionados ao modelo de Langmuir pela Equação 2.26. A concentração do enantiômero menos retido no platô intermediário foi determinada da curva de calibração do detector UV-vis e os volumes de retenção dos pontos de inflexão da curva de ruptura.

3.2.6 Avaliação da capacidade de discriminação quiral da fase estacionária em função do tempo de utilização da coluna

A capacidade de discriminação quiral da coluna SP5 foi avaliada após consecutivas injeções do TTBB e da mistura racêmica.

O número de injeções realizadas antes de cada perfil analisado (P1, P2, P3 e P4) e as condições experimentais utilizadas foram:

Perfil 1 (P1)

- 4 injeções do TTBB (composto não retido) em duplicata. $C = 3,0 \text{ mg/mL}$; $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$; FM = metanol (100%); $V_{\text{injeção}} = 20 \text{ }\mu\text{L}$; $Q = 1,0, 2,0, 3,0 \text{ e } 4,0 \text{ mL/min}$; $\lambda = 254 \text{ nm}$.
- 4 injeções da mistura racêmica do omeprazol em triplicata. $C = 0,1 \text{ mg/mL}$; $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$; FM = metanol (100%); $V_{\text{injeção}} = 20 \text{ }\mu\text{L}$; $Q = 1,0, 2,0, 3,0 \text{ e } 4,0 \text{ mL/min}$; $\lambda = 302 \text{ nm}$.

Perfil 2 (P2)

- 8 injeções do TTBB (composto não retido) em duplicata. $C = 3,0 \text{ mg/mL}$; $T = 25 \text{ e } 35 \text{ }^\circ\text{C}$; FM = metanol (100%); $V_{\text{injeção}} = 20 \text{ }\mu\text{L}$; $Q = 1,0, 2,0, 3,0 \text{ e } 4,0 \text{ mL/min}$; $\lambda = 254 \text{ nm}$.
- 8 injeções da mistura racêmica do omeprazol em triplicata. $C = 0,1 \text{ mg/mL}$; $T = 25 \text{ e } 35 \text{ }^\circ\text{C}$; FM = metanol (100%); $V_{\text{injeção}} = 20 \text{ }\mu\text{L}$; $Q = 1,0, 2,0, 3,0 \text{ e } 4,0 \text{ mL/min}$; $\lambda = 302 \text{ nm}$.

Perfil 3 (P3)

- 12 injeções do TTBB (composto não retido) em duplicata. $C = 3,0 \text{ mg/mL}$; $T = 25, 35 \text{ e } 40 \text{ }^\circ\text{C}$; FM = metanol (100%); $V_{\text{injeção}} = 20 \text{ }\mu\text{L}$; $Q = 1,0, 2,0, 3,0 \text{ e } 4,0 \text{ mL/min}$; $\lambda = 254 \text{ nm}$.

- 12 injeções da mistura racêmica do omeprazol em triplicata. $C = 0,1$ mg/mL; $T = 25, 35$ e 40 °C; FM = metanol (100%); $V_{\text{injeção}} = 20$ μL ; $Q = 1,0, 2,0, 3,0$ e $4,0$ mL/min; $\lambda = 302$ nm.

Perfil 4 (P4)

- 16 injeções do TTBB (composto não retido) em duplicata, $C = 3,0$ mg/mL; $T = 25, 35, 40$ e 50 °C; FM = metanol (100%); $V_{\text{injeção}} = 20$ μL ; $Q = 1,0, 2,0, 3,0$ e $4,0$ mL/min; $\lambda = 254$ nm.
- 16 injeções da mistura racêmica do omeprazol em triplicata. $C = 0,1$ mg/mL; $T = 25, 35, 40$ e 50 °C; FM = metanol (100%); $V_{\text{injeção}} = 20$ μL ; $Q = 1,0, 2,0, 3,0$ e $4,0$ mL/min; $\lambda = 302$ nm.

CAPÍTULO 4

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Neste capítulo são apresentados e discutidos os resultados da análise elementar e espectroscopia na região do infravermelho, necessários à caracterização do derivado de polissacarídeo, e a caracterização das partículas de sílica e da FEQ por técnicas de espalhamento de *laser* e microscopia eletrônica de varredura. Também são mostrados e discutidos os resultados pertinentes às porosidades, aos coeficientes de dispersão axial e de transferência de massa e ao comportamento termodinâmico da adsorção.

4.1 PREPARAÇÃO DAS COLUNAS CROMATOGRÁFICAS

4.1.1 Síntese do derivado de polissacarídeo

4.1.1.1 Caracterização do derivado de polissacarídeo por análise elementar

O método de análise elementar ou análise centesimal determina os elementos mais comumente encontrados em compostos orgânicos, incluindo carbono, hidrogênio e nitrogênio.

A Tabela 4.1 mostra os valores teóricos e experimentais do carbamato utilizado nas colunas A15, A25 e SP (1-9). Vale lembrar que os valores apresentados para as colunas A15 e SP são provenientes da análise realizada após a homogeneização de todos os derivados obtidos em diferentes sínteses (número de sínteses = nove).

Os resultados mostram derivações quase completas dos grupos hidroxila, com percentuais similares aos encontrados na literatura (COIMBRA, 2007; DEGANI, 2001; TIRITAN, 1996).

Tabela 4.1: Análise elementar: valores teóricos e experimentais para o tris(3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose.

Coluna A25			
	% C	% H	% N
Valores teóricos	65,66	6,18	6,96
Valores experimentais	64,54	6,09	7,62
Colunas A15 e SP			
	% C	% H	% N
Valores teóricos	65,66	6,18	6,96
Valores experimentais	63,42	6,67	7,50

4.1.1.2 Caracterização do derivado de polissacarídeo por espectroscopia na região do infravermelho

A espectroscopia na região do infravermelho está relacionada com estiramentos, vibrações e rotações moleculares, fornecendo um espectro bastante complexo que é utilizado na identificação e elucidação estrutural de substâncias orgânicas (LOPES; FASCIO, 2004).

As Figuras 4.1 e 4.2 representam, respectivamente, os espectros no infravermelho da amilose e do derivado de polissacarídeo utilizado na coluna A25. A Figura 4.3 mostra o espectro do derivado proveniente da homogeneização dos produtos das diferentes sínteses e utilizado nas colunas A15 e SP.

O espectro do infravermelho da amilose, representado na Figura 4.1, mostra a presença dos grupos hidroxila representados por uma larga e intensa absorção em 3417 cm^{-1} . Após a derivação da amilose, os espectros no infravermelho (Figuras 4.2 e 4.3) apresentaram absorções próximas a 1720 cm^{-1} , de forte intensidade, sendo estas, absorções características para a presença de de grupamentos carbonílicos (C=O). É possível também observar a presença de absorções em 1220 cm^{-1} , referente ao estiramento da ligação C-N e em 3294 cm^{-1} referente à deformação axial da ligação N-H. As bandas próximas a 1643 e 1562 cm^{-1} foram atribuídas, respectivamente, a carbonila do derivado de uréia e à deformação angular da ligação N-H.

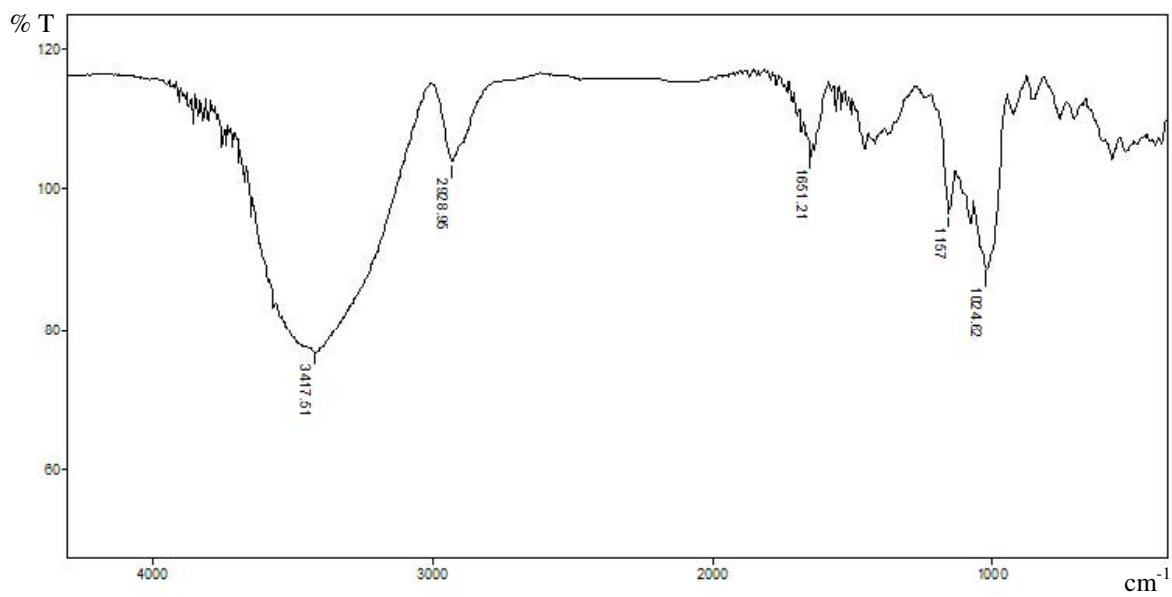


Figura 4.1: Espectro no infravermelho da amilose.

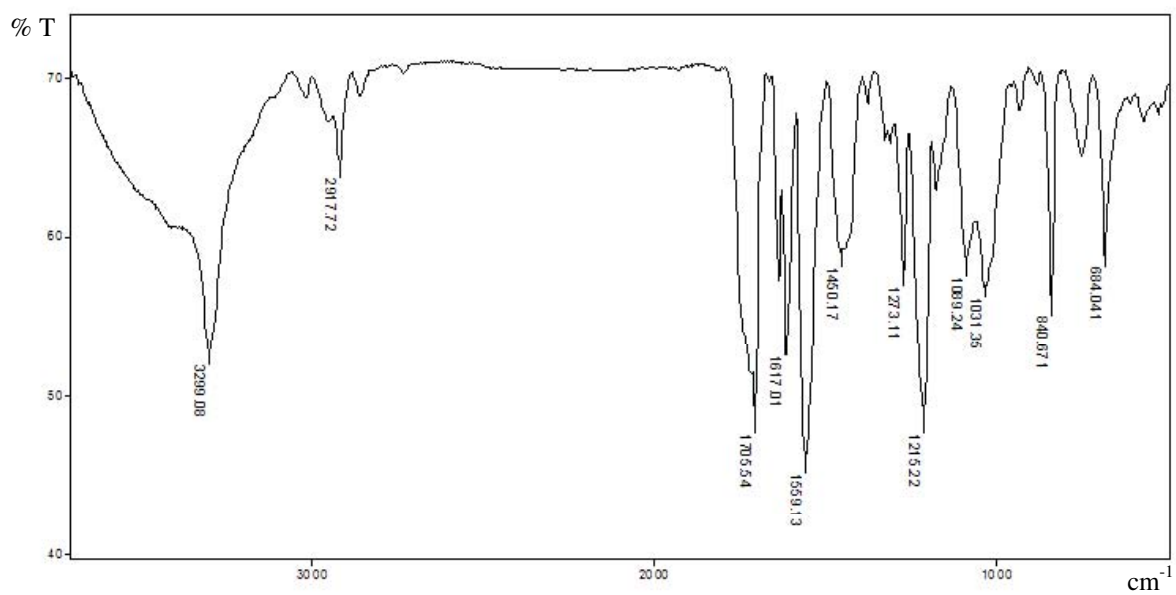


Figura 4.2: Espectro no infravermelho do carbamato utilizado no preparo da coluna A25.

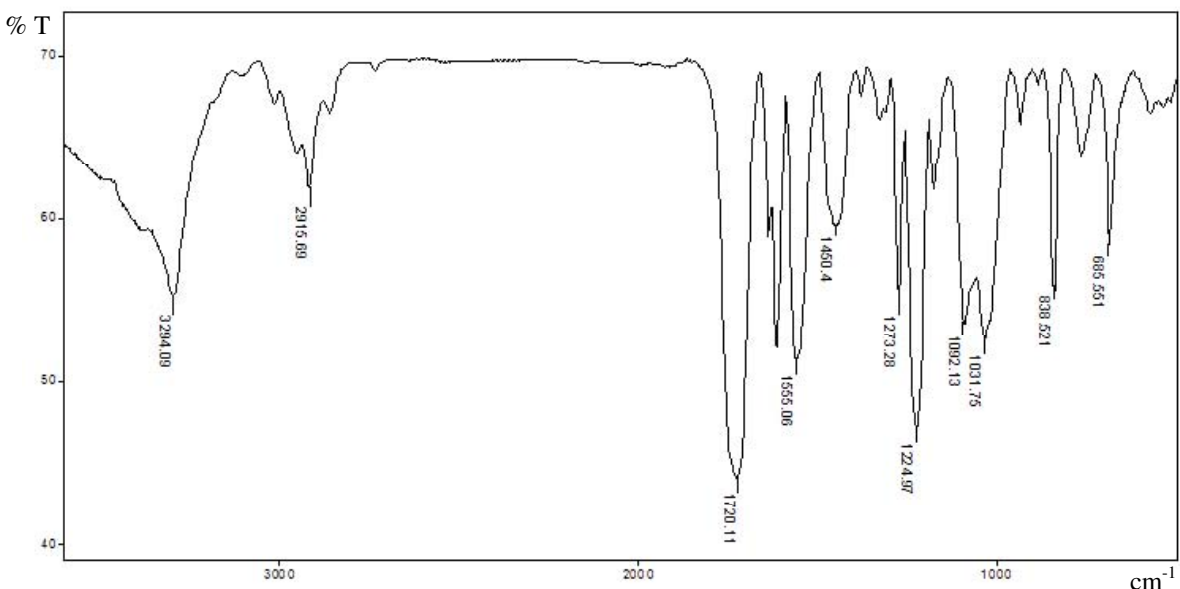


Figura 4.3: Espectro no infravermelho do carbamato utilizado no preparo das colunas A15 e SP.

4.1.2 Recobrimento do suporte de sílica pelo carbamato

O recobrimento das partículas de sílica foi realizado em um balão com formações côncavas, com o objetivo de aumentar a superfície interna do mesmo, melhorar a homogeneização e obter uma cobertura mais uniforme.

O suporte de sílica fornece a resistência mecânica para a obtenção de colunas mais eficientes e estáveis frente a modificações na composição da fase móvel (BONATO; JABOR; GAITANI, 2005; OKAMOTO; KAWASHIMA; HATADA, 1984). A derivação da sílica diminui as interações não estereoseletivas por meio da desativação dos grupos silanóis ácidos e aumenta a estabilidade da cobertura por permitir a formação de ligações de hidrogênio com o carbamato usado na cobertura do suporte (CASS et al., 1997b).

4.1.2.1 Caracterização das partículas de sílica e da FEQ por espalhamento de laser

O tamanho, a faixa de variação de diâmetro e a forma das partículas dos materiais empregados em CLAE contribuem para a uniformidade do leito cromatográfico. O tamanho e a faixa de variação de diâmetro influenciam o processo de difusão das moléculas da amostra ao penetrar e sair dos poros da partícula. Em relação à forma, as colunas empacotadas com partículas regulares (esféricas) apresentam maior resistência a altas

pressões e leitos mais uniformes e eficientes. As colunas recheadas com partículas irregulares podem resultar em maiores pressões no decorrer de sua utilização, devido à presença de partículas finas oriundas da quebra dos vértices das partículas irregulares (JARDIM; COLLINS; GUIMARÃES, 2006), além de promoverem a formação de bandas assimétricas.

Os gráficos de distribuição de tamanho de partícula da sílica Luna NH₂ e da FEQ, obtida pelo recobrimento do carbamato ao suporte, são mostrados nas Figuras 4.4 e 4.5, respectivamente.

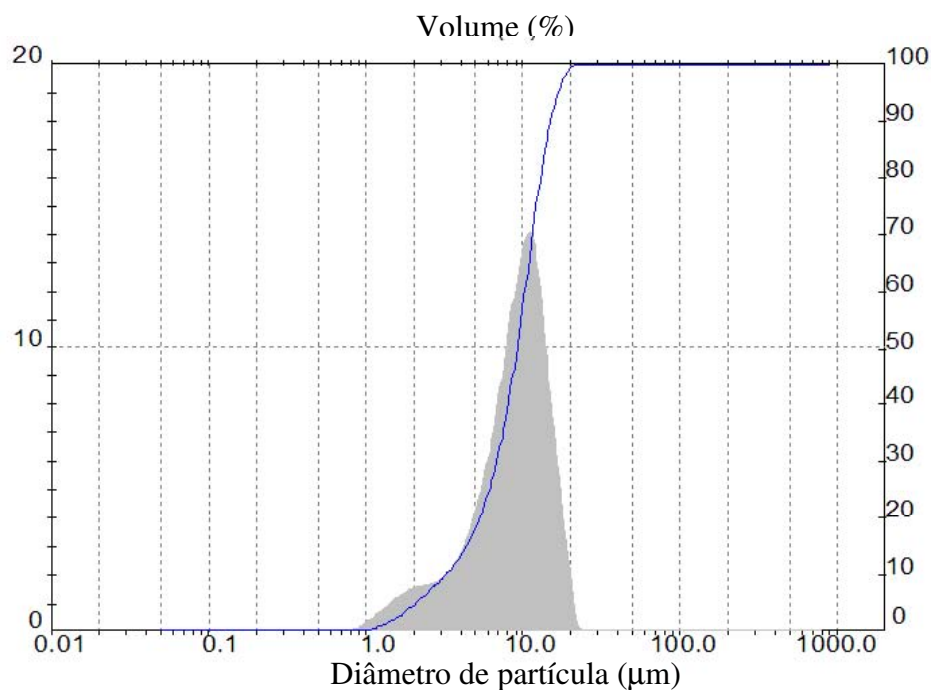


Figura 4.4: Distribuição granulométrica das partículas de sílica Luna NH₂.

Pode-se observar que a sílica tem diâmetro médio de partícula igual a 9 µm e 10% do volume total de partículas apresentam diâmetro inferior a 3 µm e 10% apresentam diâmetro superior a 15 µm. Por outro lado, o diâmetro médio de partícula da FEQ obtida é 17 µm e 10% do volume são partículas com diâmetro inferior a 4 µm e 10% são superior a 34 µm. O processo de recobrimento da sílica geralmente conduz a um aglomerado das partículas e por isso partículas com tamanhos maiores que os da sílica original são freqüentemente observadas.

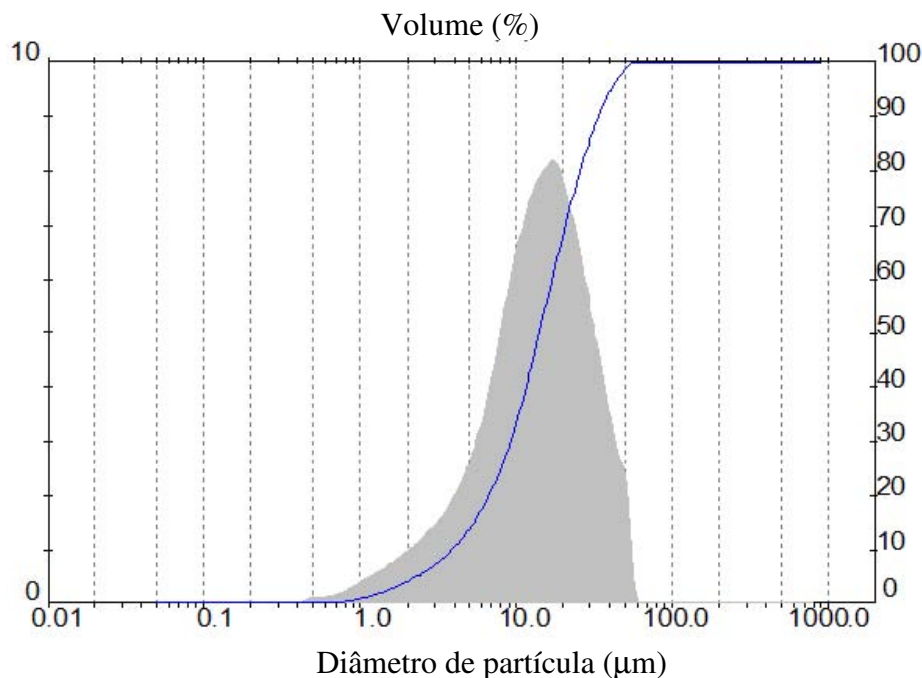


Figura 4.5: Distribuição granulométrica das partículas da FEQ.

Valores similares do diâmetro médio de partícula da sílica Luna NH₂ e da fase estacionária quiral tris(3,5-dimetilfenilcarbamato) de celulose foram obtidos por VEREDAS (2005). Neste trabalho, a sílica e a FEQ obtida, apresentaram diâmetro médio de partícula igual a 10 e 14 µm, respectivamente.

4.1.2.2 Caracterização das partículas de sílica e da FEQ por microscopia eletrônica de varredura

A Figura 4.6 mostra a esfericidade e a uniformidade das partículas de sílica Luna NH₂. O recobrimento da superfície do suporte cromatográfico pelo carbamato e a formação de aglomerados deste mesmo recobrimento são mostrados na Figura 4.7.

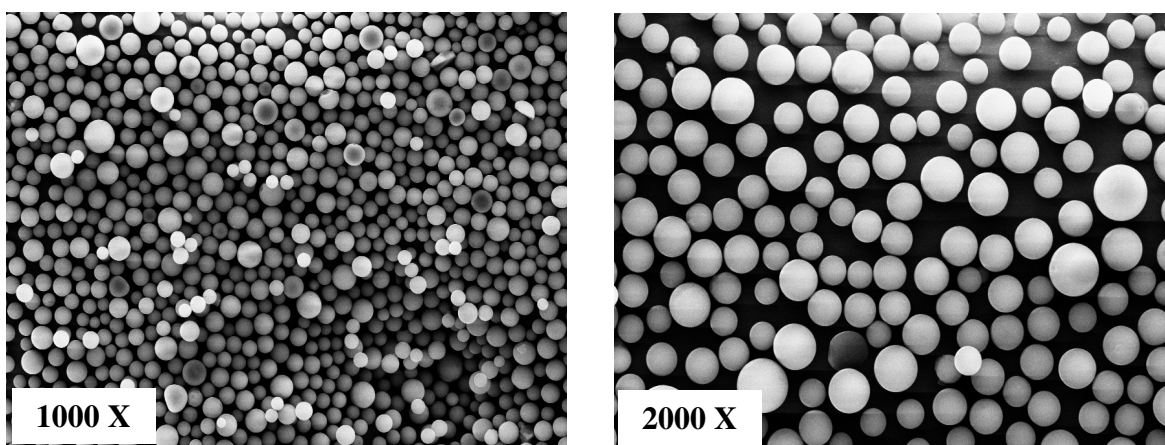


Figura 4.6: MEV das partículas de sílica Luna NH₂.

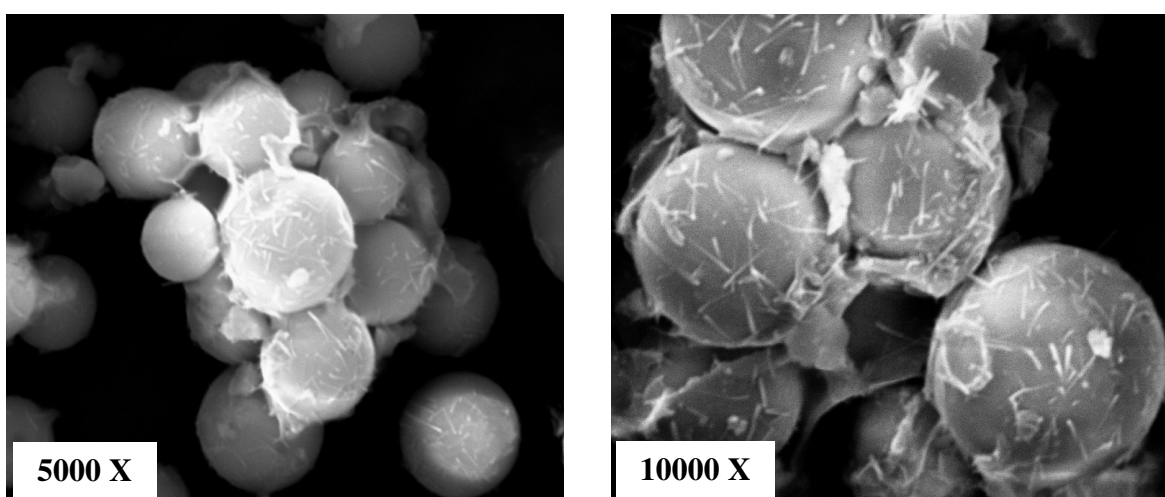


Figura 4.7: MEV das partículas da FEQ obtida.

Partículas com diâmetros inferiores 3 μm mostradas na Figura 4.5 sugere-se que sejam provenientes do desprendimento e fragmentação do carbamato da superfície das partículas de sílica. Estas pequenas partículas diminuem a permeabilidade do leito adsorvente e aumentam a queda de pressão.

4.1.3 Empacotamento das colunas cromatográficas

Após o empacotamento, as colunas cromatográficas semipreparativas foram condicionadas por 24 horas. No entanto, observou-se que decorrido o tempo de condicionamento, o detector de ultravioleta ($\lambda = 254 \text{ nm}$ e 302 nm) permanecia instável, provavelmente devido a uma aparente perda do derivado de uréia. Tal comportamento foi

diferente do exibido pelas colunas A15 e A25, no entanto, foi igual ao observado por DEGANI (2001) na preparação de uma coluna 20 x 0,7 cm D.I. contendo a mesma FEQ recoberta em suporte APS-Hypersil (120 Å, 5 µm).

De acordo com DEGANI (2001), a eliminação do excesso de fase estacionária é normal no condicionamento inicial de uma coluna, o que excede a escala de detecção do detector, mas este processo usualmente não ultrapassa 30 minutos iniciais do período de condicionamento.

Embora a maioria dos trabalhos nesta área não entre em detalhes sobre a reação de síntese do carbamato, podem ser encontrados na literatura alguns comentários sobre a obtenção de polissacarídeo não reagido e de um derivado de uréia como subproduto da reação (ABURATANI; OKAMOTO; HATADA, 1990). O polissacarídeo não reagido surge devido ao fato da reação não ter sido completa, talvez em função do mesmo ser pouco reativo. Já o derivado de uréia aparece como subproduto devido à alta reatividade do isocianato com a água (DEGANI, 2001).

O inconveniente deste evento é que a co-precipitação do derivado de uréia com o carbamato e a sua conseqüente solubilização diminui o poder de discriminação quiral da coluna e a deixa, na maioria das vezes, inadequada para o uso (COIMBRA, 2007).

Com o objetivo de identificar a substância que estava sendo eliminada, coletou-se aproximadamente 200 mL do eluente, o qual foi evaporado e originou um resíduo de característica branca. Este resíduo foi submetido à espectroscopia no infravermelho.

O espectro no infravermelho do resíduo branco obtido (Figura 4.8) apresenta bandas próximas a 1643 e 1562 cm^{-1} referentes, respectivamente, à carbonila do derivado de uréia e à deformação angular da ligação N-H. A relação entre a banda atribuída a carbonila do carbamato e as bandas atribuídas ao derivado de uréia parece ser um bom parâmetro para avaliar a qualidade do carbamato, uma vez que não é possível, pela análise elementar, verificar a presença do derivado de uréia como subproduto da reação (DEGANI, 2001).

Apesar do problema de condicionamento apresentado pelas colunas SP, devido à presença do derivado de uréia, e à inviabilidade de preparação de novos carbamatos, devido ao elevado custo dos reagentes, decidiu-se condicionar as colunas utilizando metanol como FM, com o objetivo de reduzir ou eliminar a eluição da uréia neste sistema de eluente. O

modo polar orgânico de eluição foi previamente definido neste trabalho em experimentos realizados com a coluna A25.

Aproximadamente após 1 hora de condicionamento, o sinal do detector foi estabilizado, provavelmente devido à insolubilidade do derivado de uréia em metanol.

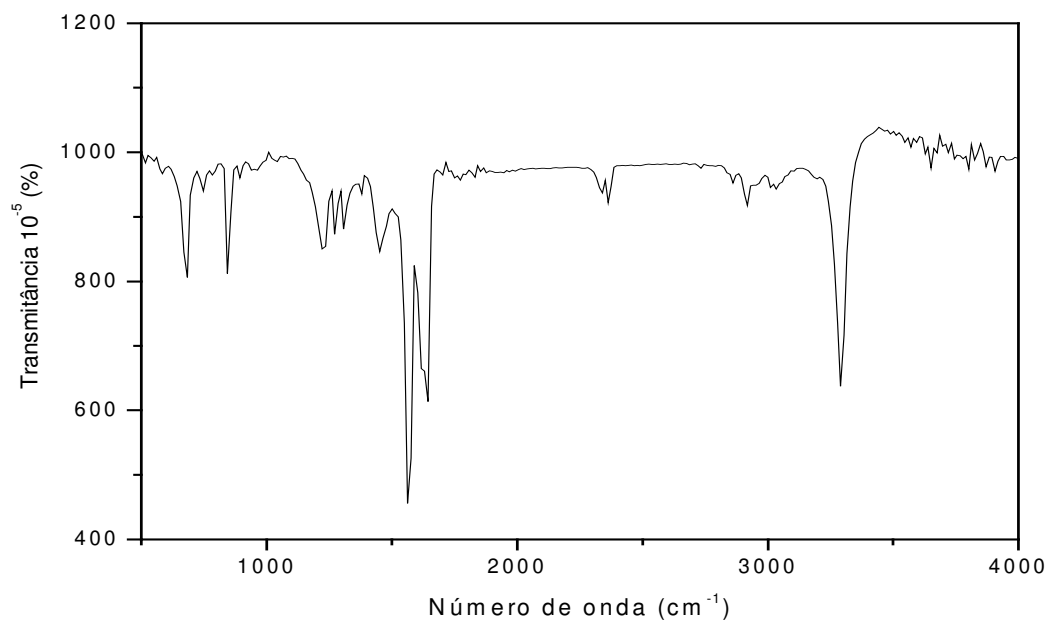


Figura 4.8: Espectro no infravermelho do derivado de uréia.

4.2 EXPERIMENTOS PRELIMINARES

4.2.1 Definição do modo de eluição

A FEQ tris(3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose em APS-Nucleosil (7 μm e 500 \AA) e APS-Hypersil (5 μm e 120 \AA), sintetizada no Laboratório de Síntese Orgânica e CLAE do Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos, apresentou elevada capacidade de resolução dos enantiômeros do omeprazol nos três modos de eluição, normal, reverso e polar orgânico (COIMBRA, 2007; DEGANI, 2001; TIRITAN, 1996). No entanto, no presente trabalho apenas os modos normal e polar orgânico de eluição foram considerados.

Os perfis de eluição da mistura racêmica na coluna A25, utilizando os modos normal e polar orgânico de eluição, são apresentados nas Figuras 4.9 e 4.10, respectivamente.

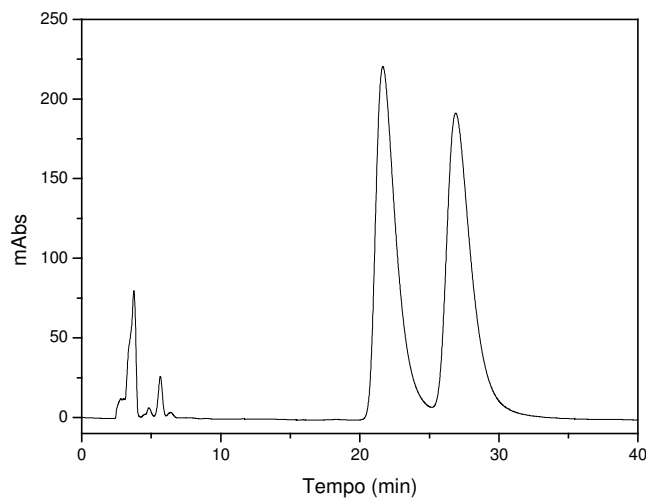


Figura 4.9: Perfil de eluição dos enantiômeros do omeprazol na coluna tris(3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose em sílica Luna NH₂ (100 Å e 9 µm). Coluna A25. Condições experimentais: T = 25 °C; FM = hexano:etanol (70:30 v/v); V_{injeção} = 20 µL; Q = 1,0 mL/min; λ = 302 nm.

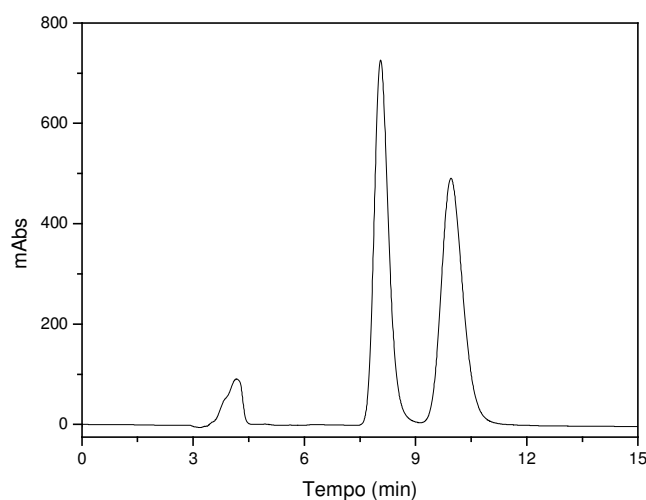


Figura 4.10: Perfil de eluição dos enantiômeros do omeprazol na coluna tris(3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose em sílica Luna NH₂ (100 Å e 9 µm). Coluna A25. Condições experimentais: T = 25 °C; FM = metanol (100%); V_{injeção} = 20 µL; Q = 1,0 mL/min; λ = 302 nm.

Pela análise dos cromatogramas, observou-se uma redução significativa no tempo de retenção dos enantiômeros e uma melhor resolução quando o modo polar orgânico foi utilizado. Deste modo, metanol (100%) foi a FM utilizada em todas as análises cromatográficas.

4.2.2 Avaliação da ordem de eluição do par enantiomérico e do sentido da rotação da luz circularmente polarizada

A Figura 4.11 mostra o perfil de eluição da mistura racêmica e do enantiômero S-(-)-omeprazol que corresponde ao enantiômero menos retido.

A Figura 4.12 mostra o perfil de eluição da mistura racêmica do omeprazol referente ao sinal do detector por absorvância no UV-vis e ao sinal do detector por dicroísmo circular. O enantiômero menos retido e que apresenta desvio negativo da luz circularmente polarizada é o S-(-)-omeprazol e o enantiômero mais retido e que apresenta desvio positivo é o R-(+)-omeprazol.

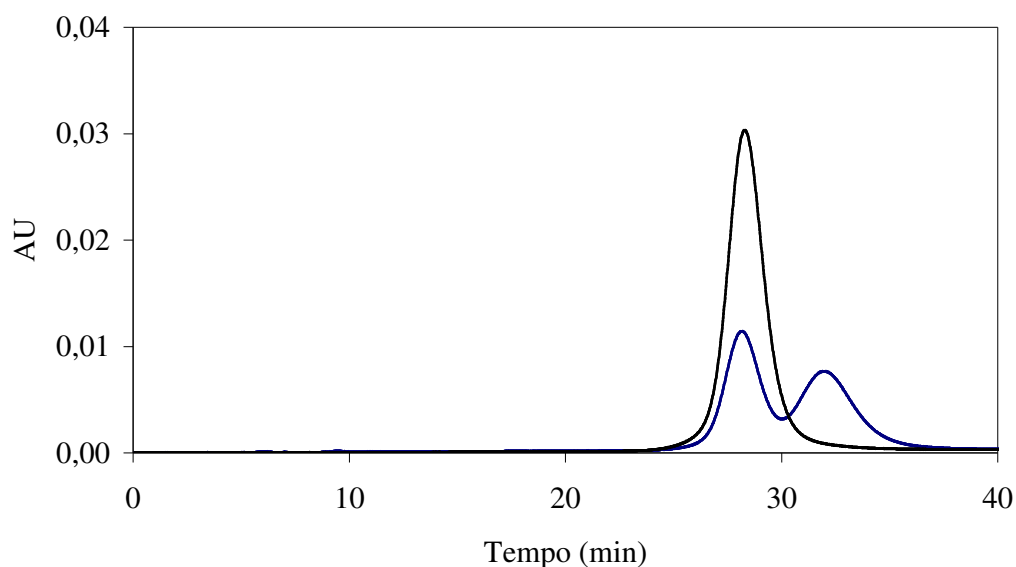


Figura 4.11: Perfil de eluição da mistura racêmica e do enantiômero S-(-)-omeprazol. Coluna SP1. Condições experimentais: $C_{\text{mistura racêmica}} = 0,1 \text{ mg/mL}$; $C_{\text{S-(-)-omeprazol}} = 0,2 \text{ mg/mL}$; $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$; FM = metanol (100%); $V_{\text{injeção}} = 20 \text{ } \mu\text{L}$; $Q = 3,0 \text{ mL/min}$; $\lambda = 302 \text{ nm}$.

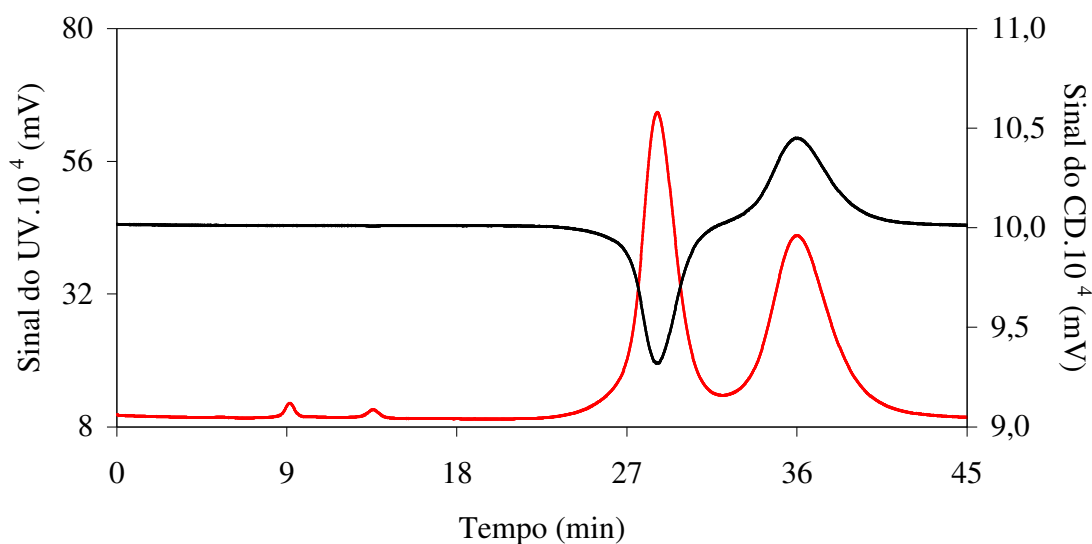


Figura 4.12: Perfil de eluição da mistura racêmica do omeprazol. Coluna SP9. Condições experimentais: $C = 25,0$ mg/mL; $T = 25$ °C; FM = metanol (100%); $V_{\text{injeção}} = 20$ μ L; $Q = 2,0$ mL/min; $\lambda = 302$ nm.

4.3 AVALIAÇÃO DAS POROSIDADES

O TTBB (Figura 4.13), utilizado na determinação da porosidade total, é um composto que não sofre interações com a FEQ, apresenta massa molecular relativamente baixa ($MM = 264,44$ g/mol) e percorre a coluna através dos poros das partículas e dos espaços vazios existentes entre elas. Este composto tem sido utilizado por muitos autores para determinar a porosidade total de colunas cromatográficas comerciais Chiralpak AD (ARAÚJO; RODRIGUES; MOTA, 2008; MILHBACHLER et al., 2002a; MILHBACHLER et al., 2006; MILHBACHLER; SEIDEL-MORGENSTERN; GUIOCHON, 2004; ZABKA; RODRIGUES, 2007).

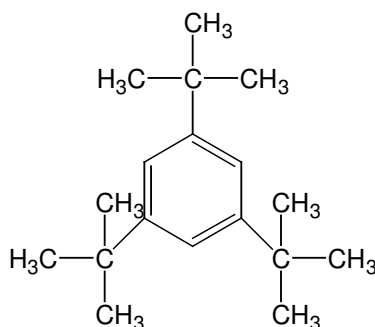


Figura 4.13: Estrutura molecular do 1,3,5-tri-*tert*-butilbenzeno (TTBB).

A Tabela 4.2 mostra o tempo de retenção do TTBB no volume morto do sistema de análise (t_{V_0}), na ausência da coluna cromatográfica, em diferentes vazões da FM.

Tabela 4.2: Tempo de retenção do TTBB no volume morto do sistema cromatográfico.

Q (mL/min)	t_{V_0} (min)
0,2	0,4
1,0	0,08
2,0	0,04
3,0	0,03
4,0	0,02

Condições experimentais: T = 25 °C; C = 3,0 mg/mL; FM = metanol (100%); $V_{\text{injeção}} = 20 \mu\text{L}$; $\lambda = 254 \text{ nm}$.

O volume total de um leito empacotado é dividido em dois sub-volumes: o volume intersticial da FM e o volume da FEQ. A porosidade total é definida como o somatório do volume intersticial da FM e do volume do poro dividido pelo volume da coluna. A porosidade do leito é dada pelo quociente entre o volume intersticial da FM e o volume da coluna. Tais parâmetros são funções apenas da geometria e do tamanho das partículas e da densidade do empacotamento, não devendo variar com a vazão da FM e a temperatura.

O aumento da vazão da FM pode danificar tanto a fase estacionária da coluna quanto a homogeneidade do empacotamento em função das variações de pressão e pressão de operação superior à pressão do empacotamento. Neste trabalho, a pressão de operação

em diferentes temperaturas e vazões, foi inferior à pressão utilizada no empacotamento (~ 517 bar) e à pressão máxima recomendada pelo fornecedor das colunas comerciais Chiralpak AD (~ 100 bar).

O aumento da temperatura diminui a viscosidade da FM e reduz, conseqüentemente, a pressão na coluna. No entanto, o tempo de retenção do TTBB não deve ser afetado pela variável temperatura por ser um composto não retido pela FEQ. Logo, a porosidade total da coluna também não devem ser influenciada pela elevação da temperatura.

Segundo SCHMIDT-TRAUB (2005), medidas de queda de pressão são utilizadas para avaliar a estabilidade de colunas como uma função da vazão da FM. Desvios da linearidade indicam mudanças irreversíveis no leito.

As Figuras 4.14-17 mostram a queda de pressão ($\Delta P/L$) em função da velocidade superficial da FM (u). Pode-se observar uma relação linear entre $\Delta P/L$ e u em todas as temperaturas analisadas, indicando que as propriedades do leito não sofreram alterações com o aumento da temperatura e da vazão da FM.

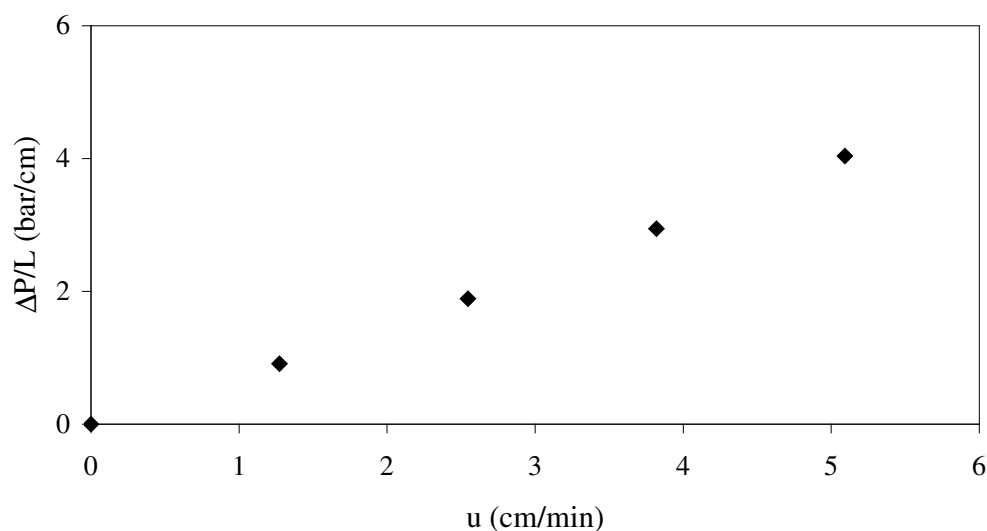


Figura 4.14: Avaliação da queda de pressão em função da velocidade superficial da FM. Coluna SP1. Condições experimentais: $T = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$; $C = 3,0\text{ mg/mL}$; FM = metanol (100%); $V_{\text{injeção}} = 20\text{ }\mu\text{L}$; $\lambda = 254\text{ nm}$.

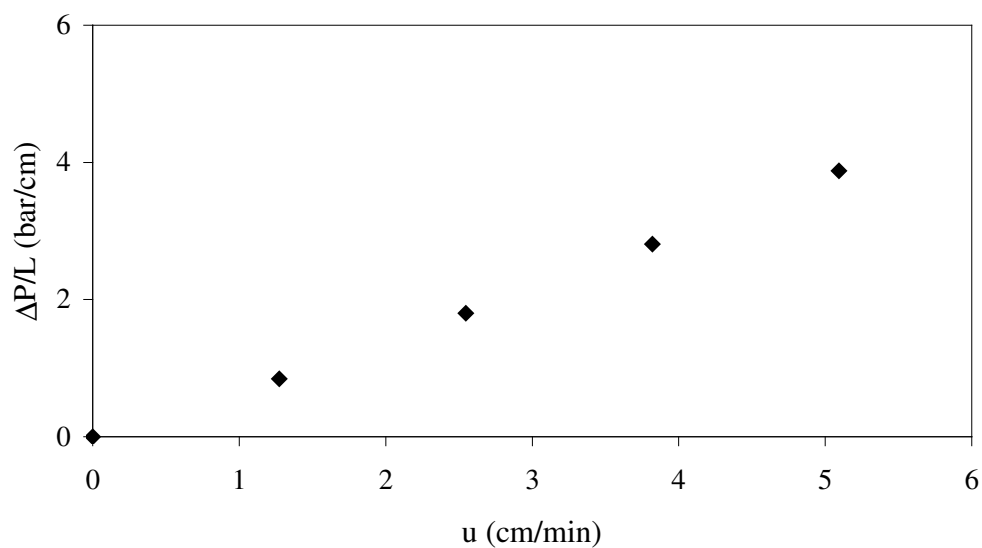


Figura 4.15: Avaliação da queda de pressão em função da velocidade superficial da FM. Coluna SP1. Condições experimentais: $T = 30\text{ }^{\circ}\text{C}$; $C = 3,0\text{ mg/mL}$; FM = metanol (100%); $V_{\text{injeção}} = 20\text{ }\mu\text{L}$; $\lambda = 254\text{ nm}$.

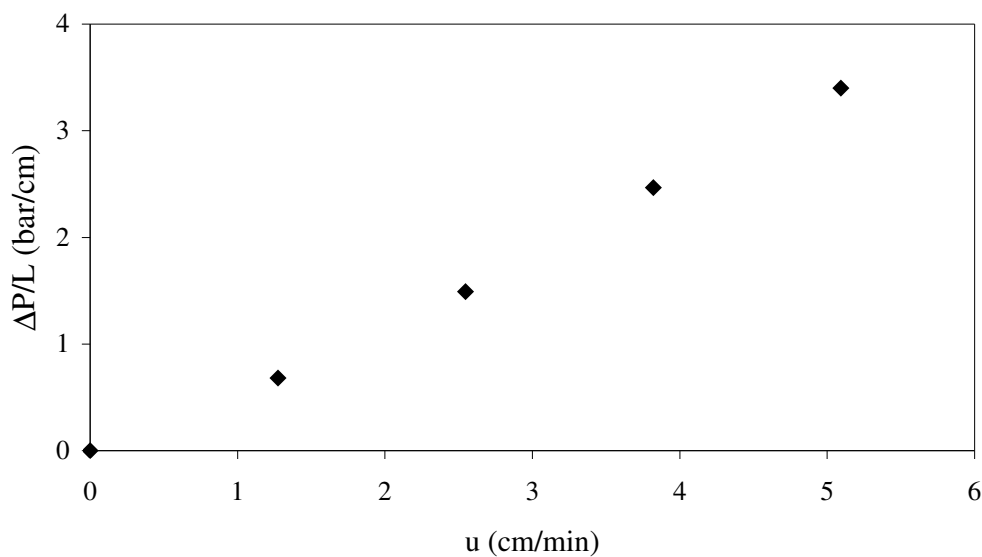


Figura 4.16: Avaliação da queda de pressão em função da velocidade superficial da FM. Coluna SP1. Condições experimentais: $T = 40\text{ }^{\circ}\text{C}$; $C = 3,0\text{ mg/mL}$; FM = metanol (100%); $V_{\text{injeção}} = 20\text{ }\mu\text{L}$; $\lambda = 254\text{ nm}$.

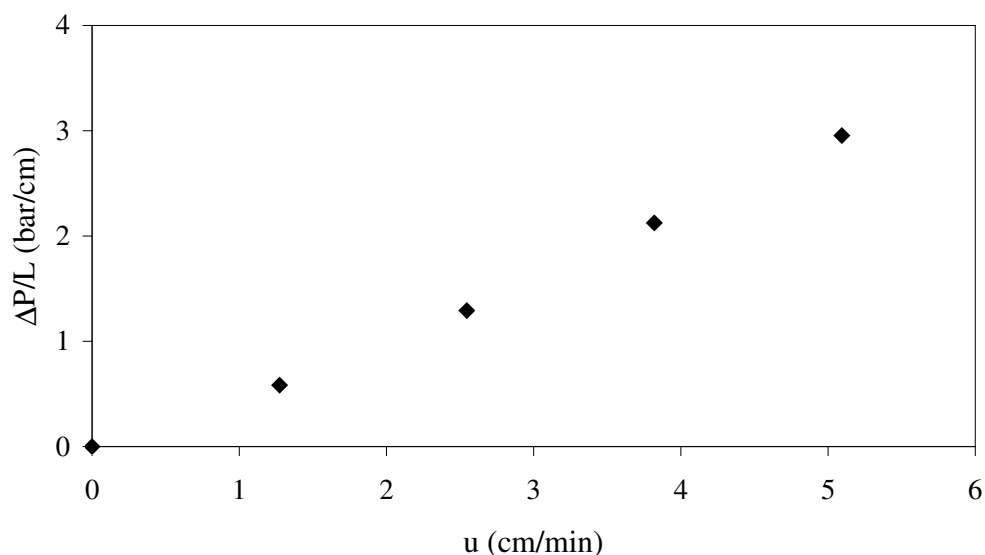


Figura 4.17: Avaliação da queda de pressão em função da velocidade superficial da FM. Coluna SP1. Condições experimentais: T = 50 °C; C = 3,0 mg/mL; FM = metanol (100%); $V_{\text{injeção}} = 20 \mu\text{L}$; $\lambda = 254 \text{ nm}$.

Diante do exposto acima, a porosidade total da coluna é função apenas da geometria e do tamanho das partículas e da densidade do empacotamento. Assim, com o objetivo de avaliar a existência de um intervalo comum, entre as porosidades de cada coluna e em uma mesma coluna em diferentes temperaturas e vazões, e conseqüentemente gerar uma confiabilidade estatística para a média, aplicou-se o teste t. A porosidade total foi determinada utilizando-se a Equação 3.1. O intervalo de confiança de cada medida foi calculado através da Equação 4.1.

$$t_{N_{\text{exp}}-1} = \frac{\frac{\bar{x} - \mu}{s}}{\sqrt{N_{\text{exp}}}} \quad (4.1)$$

onde N_{exp} é o número de réplicas dos experimentos, \bar{x} é a média amostral, s é o desvio padrão e $t_{N_{\text{exp}}-1}$ é o valor da distribuição t com $N_{\text{exp}} - 1$ graus de liberdade.

A Figura 4.18 mostra a variação da porosidade total na coluna SP1, em função da vazão da FM. A Figura 4.19 mostra a variação na coluna SP7, em função da temperatura. As barras verticais representam o intervalo de confiança do valor médio de porosidade, em cada vazão e temperatura.

Pode-se observar que nem todos os valores de ε_T podem ser considerados estatisticamente equivalentes em um nível de significância de 95%. O mesmo comportamento foi observado nas demais colunas SP. Tal dispersão pode ser atribuída a erros decorrentes do método de determinação da porosidade total. SARTOR (2006) verificou variações de até 7% na porosidade total quando realizou experimentos em diferentes temperaturas e vazões. A coluna utilizada pelo autor foi a Kromasil[®] CHI-TBB (25 x 1,0 cm D.I.) comercializada pela EKA Chemicals (Suécia).

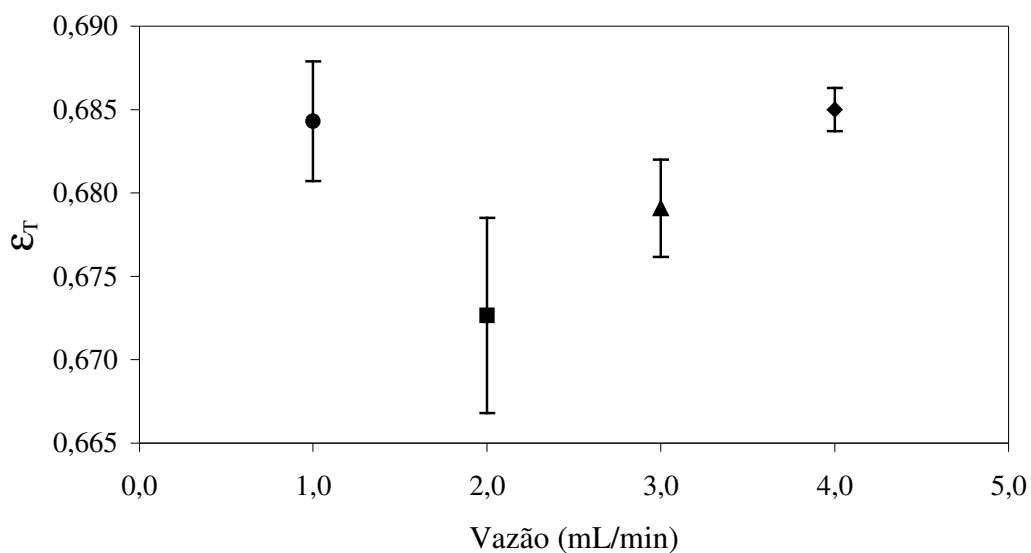


Figura 4.18: Porosidade total em função da vazão da FM e seus respectivos intervalos de confiança. Coluna SP1. Condições experimentais: T = 25 °C; C = 3,0 mg/mL; FM = metanol (100%); $V_{\text{injeção}} = 20 \mu\text{L}$; $\lambda = 254 \text{ nm}$.

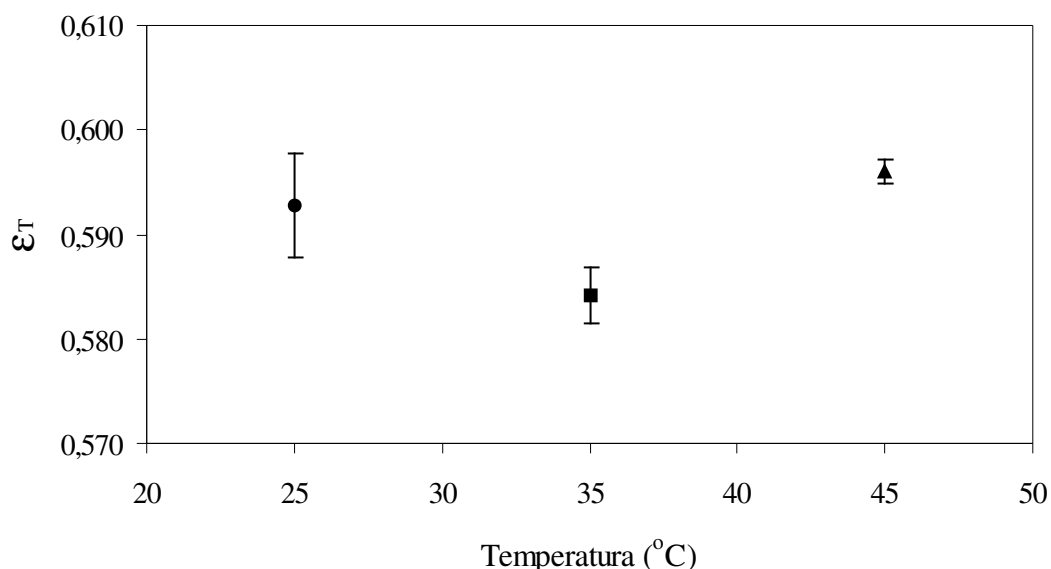


Figura 4.19: Porosidade total em função da temperatura e seus respectivos intervalos de confiança. Coluna SP7. Condições experimentais: $Q = 1,0$ mL/min; $C = 3,0$ mg/mL; FM = metanol (100%); $V_{\text{injeção}} = 20$ μ L; $\lambda = 254$ nm.

A porosidade total média de cada coluna e seus respectivos intervalos de confiança são apresentados na Figura 4.20. A porosidade foi determinada a 25 °C utilizando-se todas as vazões (1,0, 2,0, 3,0 e 4,0 mL/min) e suas respectivas réplicas. O intervalo de confiança foi calculado considerando 8 réplicas para as colunas SP1 e SP5 e 12 réplicas para as colunas SP2, SP3, SP4, SP6, SP7, SP8 e SP9.

De acordo com os resultados apresentados, pode-se observar que apenas algumas colunas apresentaram valores de ϵ_T equivalentes, em um nível de confiança de 95%. Os dados obtidos também mostram a existência de uma fonte de erro proveniente do método de empacotamento. As nove colunas não apresentaram porosidades equivalentes embora a massa de adsorvente e as condições experimentais, utilizadas no empacotamento de cada coluna, tenham sido as mesmas. Além dessa fonte de erro, vale ressaltar que muito provavelmente exista o erro relacionado ao método de determinação da porosidade total, como mostrado anteriormente nas Figuras 4.18 e 4.19.

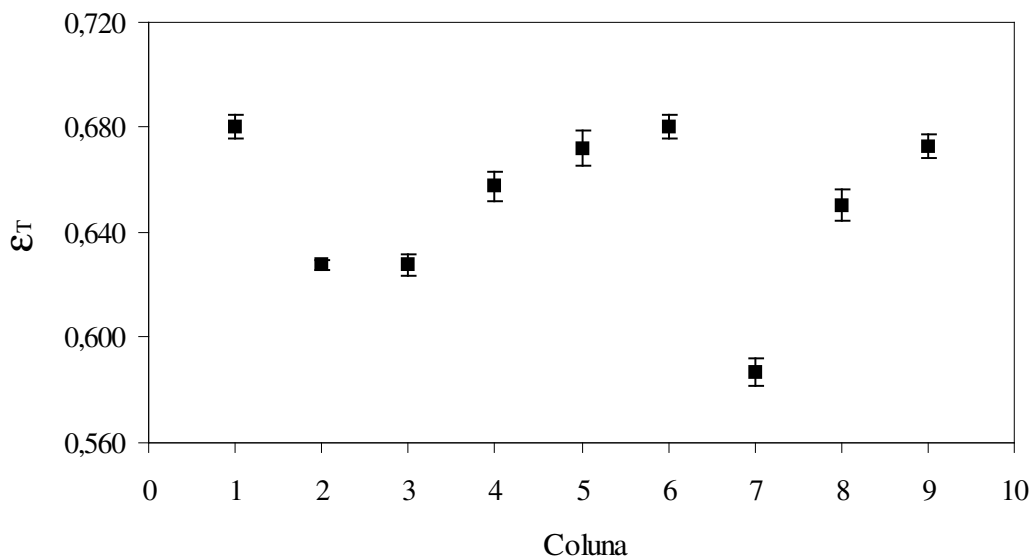


Figura 4.20: Porosidade total de cada coluna e seus respectivos intervalos de confiança. Condições experimentais: T = 25 °C; C = 3,0 mg/mL; FM = metanol (100%); V_{injeção} = 20 μL; λ = 254 nm.

4.3.1 Avaliação dos erros

Com o objetivo de avaliar se os erros cometidos ao determinar as porosidades de uma mesma coluna em diferentes vazões e temperaturas e se os erros do método de empacotamento cometidos em cada coluna, são equivalentes ou não, foram realizados testes estatísticos baseados na análise da variância. Estes testes visam, fundamentalmente, verificar se existe diferença significativa entre as amostras e se as variáveis independentes exercem influência em alguma variável dependente. Desta forma foi realizado o teste F nos dados de porosidades obtidos, conforme mostra a Equação 4.2 (SEVERO JR., 2008).

$$F_{xy}^* = \frac{\sigma_x^2}{\sigma_y^2} \quad (4.2)$$

onde F_{xy}^* é o valor de F calculado e σ_x^2 e σ_y^2 são as variâncias dos grupos amostrais. Neste trabalho, os grupos amostrais são a porosidade total de cada coluna e a porosidade total de uma mesma coluna em diferentes temperaturas e vazões da fase móvel.

Em seguida avaliou-se o valor calculado de F_{xy}^* , verificando se o mesmo encontra-se dentro dos limites estabelecidos na Equação 4.3.

$$\left(\frac{1}{F_{100-p\%}}, v_2, v_1 \right) \langle F^* \langle (F_{p\%}, v_1, v_2) \rangle \quad (4.3)$$

onde v_1 e v_2 representam o grau de liberdade dos conjuntos amostrais analisados e $F_{p\%}$ e $F_{100-p\%}$ são valores tabelados de F para um determinado nível de confiança.

Se o valor do F^* ($F_{\text{calculado}}$), considerando um nível de significância de 95% ($p = 0,025\%$), for maior que $F_{0,025}$ ou menor que $\frac{1}{F_{0,975}}$, significa que os erros não são equivalentes. Vale ressaltar que todos os testes estatísticos apresentados admitem implicitamente a distribuição normal dos dados experimentais.

Até o momento, duas informações podem ser obtidas dos dados de porosidade baseando-se no teste F. A primeira está relacionada aos erros cometidos durante a determinação da porosidade total em cada coluna, em diferentes vazões e temperaturas. A segunda é referente aos erros cometidos no processo de empacotamento.

A Figura 4.21 mostra a metodologia utilizada neste trabalho, para avaliar se os erros cometidos nos métodos de determinação da porosidade total e empacotamento, são equivalentes ou não.

Para avaliar os erros referentes ao método de determinação da porosidade total de uma mesma coluna em diferentes vazões, foi realizado um teste F entre as variâncias das porosidades obtidas em cada vazão para verificar se estas são equivalente ou não, ou seja, se os erros são semelhantes ou não.

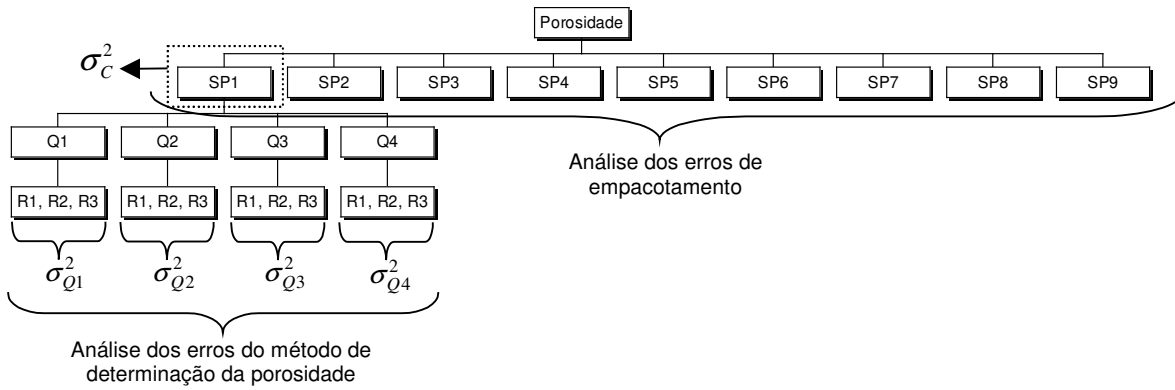


Figura 4.21: Diagrama esquemático ilustrando a metodologia de avaliação dos erros pela análise do teste F. R_1 , R_2 e R_3 representam as réplicas dos tempos de retenção do TTBB na FEQ, σ_{Q1}^2 , σ_{Q2}^2 , σ_{Q3}^2 e σ_{Q4}^2 representam as variâncias da porosidade total em cada vazão e σ_c^2 representa a variância da porosidade total de cada coluna.

A Figura 4.22 mostra os valores de F_{tabelado} , representados pelas linhas horizontais, e os valores de $F_{\text{calculado}}$, considerando um nível de confiança de 95%.

Estes resultados mostram que as variâncias são equivalentes, ou seja, que os erros cometidos na determinação das porosidades nas diferentes vazões estudadas foram os mesmos. Contudo, a análise dos dados com o teste t mostrou que as porosidades obtidas em diferentes vazões diferem entre si, o que conduz à hipótese da existência de algum erro relacionado ao método de determinação da porosidade total. No entanto, essa hipótese ainda se mantém, uma vez que os resultados obtidos com o teste F mostraram apenas que os erros cometidos ao injetar o TTBB, duas ou três vezes em cada vazão, são equivalentes embora os valores de porosidade não o sejam. O mesmo comportamento mostrado na Figura 4.22 foi observado nas demais colunas.

Os erros relacionados ao processo de empacotamento também foram avaliados aplicando-se o teste F entre as variâncias das porosidades de cada coluna. Neste caso, as porosidades obtidas em cada vazão foram consideradas e utilizadas nos cálculos de determinação das porosidades médias de cada coluna e de suas respectivas variâncias. Em seguida, as colunas foram comparadas entre si com o objetivo de avaliar se os erros relacionados ao processo de empacotamento são equivalentes ou não. Estas análises são mostradas na Figura 4.23.

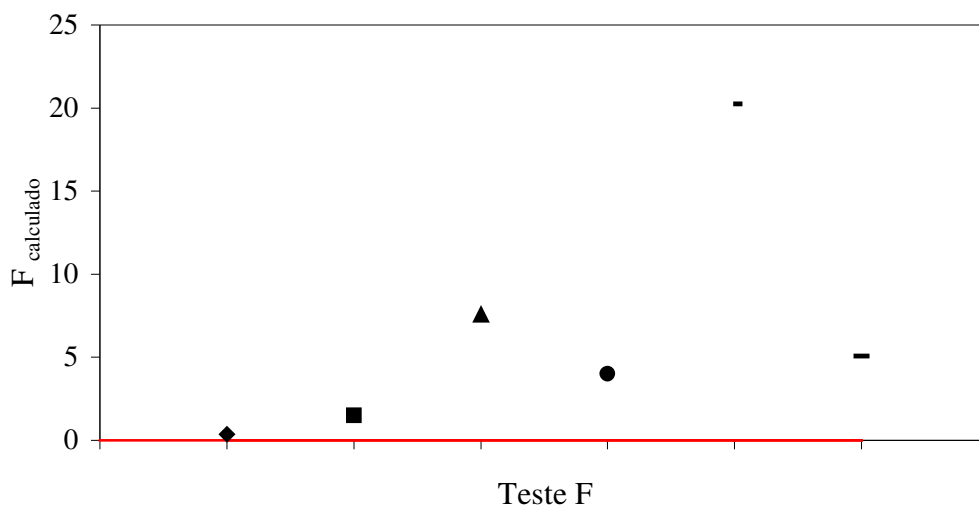


Figura 4.22: Valores do teste F entre as variâncias da porosidade total em diferentes vazões de FM (◆ Q1-Q2; ■ Q1-Q3; ▲ Q1-Q4; ● Q2-Q3; - Q2-Q4; — Q3-Q4; $F_{0,975} = 0,0015$ (—); $F_{0,025} = 647,7890$ (—)). Coluna SP1. Condições experimentais: $T = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$; $C = 3,0\text{ mg/mL}$; FM = metanol (100%); $V_{\text{injeção}} = 20\text{ }\mu\text{L}$; $\lambda = 254\text{ nm}$.

De acordo com os resultados apresentados (Figura 4.23), o teste F mostrou que os erros cometidos no processo de empacotamento de cada coluna são os mesmos, exceto para a coluna SP2, dado que os valores de $F_{\text{calculado}}$ ficaram fora dos limites de F_{tabelado} . Mais uma vez este teste mostrou que, embora os erros cometidos ao empacotar cada coluna sejam os mesmos durante todo o processo, as porosidades de cada coluna não são equivalentes. O fato da coluna SP2 ter apresentado valores fora do intervalo de F_{tabelado} , indica que os erros experimentais praticados durante o empacotamento desta coluna são diferentes dos erros das demais.

O teste F também foi aplicado entre as variâncias das porosidades obtidas em cada temperatura. O objetivo foi verificar se os erros relacionados ao método de determinação da porosidade total, ao variar a temperatura, são semelhantes ou não. A Figura 4.24 mostra os valores de F_{tabelado} , representados pelas linhas horizontais, e os valores de $F_{\text{calculado}}$, considerando um nível de confiança de 95%.

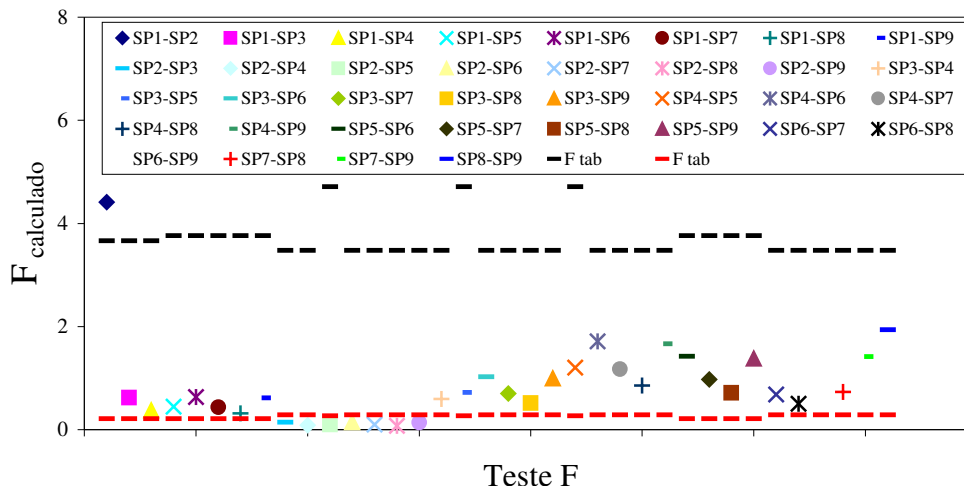


Figura 4.23: Valores do teste F entre as variâncias da porosidade total de cada coluna. Condições experimentais: $Q = 3,0$ mL/min; $T = 25$ °C; $C = 3,0$ mg/mL; FM = metanol (100%); $V_{\text{injeção}} = 20$ μ L; $\lambda = 254$ nm.

Pode-se observar que, com 95% de confiabilidade, as variâncias dos dados foram equivalentes, ou seja, os erros cometidos na determinação das porosidades apresentaram a mesma variabilidade nas diferentes temperaturas analisadas. Contudo, pela análise do teste t observou-se que as porosidades das colunas obtidas em diferentes temperaturas são diferentes entre si, considerando a suposição da existência de algum erro relacionado ao método de determinação da porosidade total. Essa suposição pode ser mantida, uma vez que os resultados obtidos com o teste F mostraram apenas que os erros cometidos, ao injetar o TTBB duas ou três vezes em cada temperatura, têm estatisticamente a mesma variabilidade. No entanto, isso não significa que a porosidade total possa ser considerada equivalente. Todas as outras colunas apresentaram comportamento equivalente ao mostrado na Figura 4.24.

A porosidade da partícula (ϵ_p) foi calculada a partir dos valores de densidade do sólido e do volume total de poros, sendo seu valor igual a 0,433. A Tabela 4.3 mostra os valores médios das porosidades e seus respectivos intervalos de confiança em cada coluna.

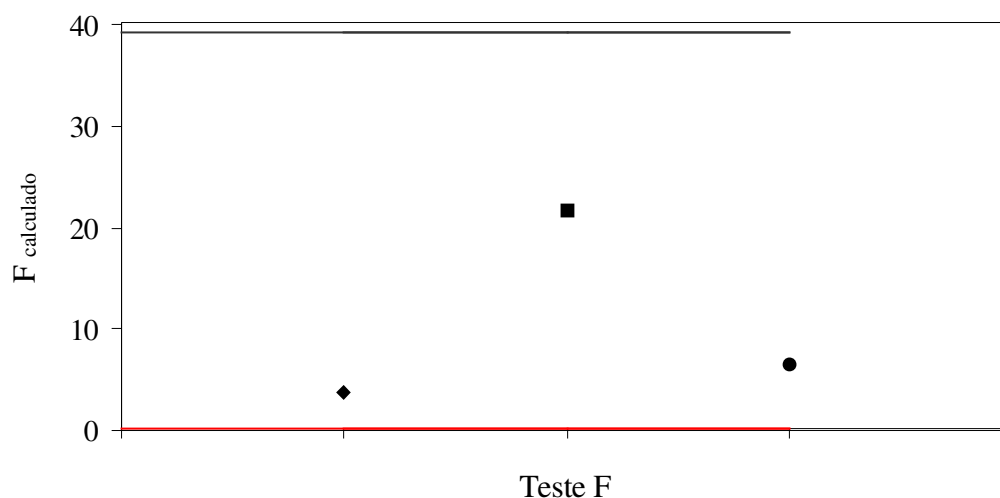


Figura 4.24: Valores do teste F entre as variâncias da porosidade total em diferentes temperaturas (♦ T₁-T₂; ■ T₁-T₃; • T₂-T₄; F_{0,975} = 0,0256 (—); F_{0,025} = 39,0000 (—)). Coluna SP7. Condições experimentais: Q = 1,0 mL/min; C = 3,0 mg/mL; FM = metanol (100%); V_{injeção} = 20 µL; λ = 254 nm.

Tabela 4.3: Porosidades médias das colunas.

Coluna	ε_T	ε
SP1	0,680 ± 0,004	0,436 ± 0,007
SP2	0,628 ± 0,002	0,344 ± 0,003
SP3	0,693 ± 0,004	0,459 ± 0,007
SP4	0,658 ± 0,006	0,40 ± 0,01
SP5	0,672 ± 0,007	0,42 ± 0,01
SP6	0,680 ± 0,004	0,436 ± 0,007
SP7	0,587 ± 0,005	0,272 ± 0,009
SP8	0,650 ± 0,006	0,383 ± 0,001
SP9	0,673 ± 0,004	0,423 ± 0,007

Condições experimentais: T = 25 °C; C = 3,0 mg/mL; FM = metanol (100%); V_{injeção} = 20 µL; λ = 254 nm.

Os valores de ε_T encontrados na literatura para colunas comerciais Chiralpak AD são apresentados na Tabela 4.4.

Tabela 4.4: Porosidade total de colunas comerciais Chiralpak AD.

Literatura	Dimensões da coluna	ε_T
ARAÚJO; RODRIGUES; MOTA (2008)	10 x 1,0 cm D.I.	0,626
MILHBACHLER et al. (2006)	10 x 1,0 cm D.I.	0,648
MILHBACHLER et al. (2002a)		
Coluna 2		0,643
Coluna 4		0,648
Coluna 5		0,645
Coluna 8	10 x 1,0 cm D.I.	0,642
Coluna 9		0,645
Coluna 11		0,651
Coluna 12		0,650
Coluna 13		0,651
Coluna 14		0,654
ZABKA; RODRIGUES (2007)	25 x 1,0 cm D.I.	0,610

4.3.2 Avaliação da influência da porosidade total na cromatografia preparativa em batelada

Diante do exposto na seção 2.13, avaliou-se a influência da porosidade total na recuperação do enantiômero S-(-)-omeprazol em um processo cromatográfico preparativo em batelada. Tal variável de desempenho foi calculada a partir do perfil de concentração dos enantiômeros e este obtido através da resolução numérica da Equação 2.31. O programa computacional foi desenvolvido em linguagem Fortran.

A concentração da alimentação, o volume de injeção, a vazão da FM e o excesso enantiomérico foram mantidos constantes e iguais a 5,0 mg/mL, 200 μ L, 2,0 mL/min e 99,9%, respectivamente. A base de referência do excesso enantiomérico foi a patente do medicamento Nexium[®] (esomeprazol magnésio) (LINDBERG; VON UNGE, 2005).

A Tabela 4.5 mostra os valores dos dados de entrada, porosidade total, constantes de Henry (H) e constantes de associação das isotermas (b), e seus respectivos intervalos de confiança. As constantes de Henry obtidas em cada coluna semipreparativa e as constantes de associação das isotermas, as quais permaneceram constantes uma vez que foram determinadas apenas na coluna SP6, serão apresentadas posteriormente na seção 4.5.

Foram avaliados dois conjuntos de dados e realizadas 50 simulações com cada um. No primeiro conjunto avaliou-se a recuperação na coluna SP9. No segundo, a variável de desempenho foi avaliada levando-se em consideração a porosidade total média das colunas SP1, SP3, SP4, SP5, SP6, SP8 e SP9. Cada simulação gerou um perfil de concentração diferente devido aos dados de entrada serem aleatoriamente escolhidos pelo programa, dentro do próprio intervalo de confiança.

Tabela 4.5: Dados de entrada.

	Coluna SP9	Colunas SP*
Porosidade total	$0,673 \pm 0,004$	$0,67 \pm 0,01$
H (S(-)-omeprazol)	$7,1 \pm 0,2$	$7,2 \pm 0,5$
H (R(+)-omeprazol)	$9,3 \pm 0,2$	$9,3 \pm 0,6$
b (S(-)-omeprazol)	$0,368 \pm 0,007$	$0,368 \pm 0,007$
b (R(+)-omeprazol)	$0,45 \pm 0,02$	$0,45 \pm 0,02$

* Colunas SP1, SP3, SP4, SP5, SP6, SP8 e SP9.

A Figura 4.25 mostra os valores percentuais da recuperação do S(-)-omeprazol obtidos com o primeiro conjunto de dados. A linha horizontal representa a recuperação obtida com o valor médio dos parâmetros de entrada. Pode-se observar que variações da ordem de 1% na porosidade total (0,669-0,677) implicam em uma recuperação na faixa de 51 a 100%. O valor médio dos dados forneceu uma recuperação de $92 \pm 3\%$.

Os valores percentuais obtidos com o segundo conjunto de dados, são mostrados na Figura 4.26. Neste caso, a recuperação do enantiômero de interesse variou de 10 a 100% quando consideradas variações da ordem de 3% na porosidade total (0,66-0,68). A recuperação média foi de $78 \pm 10\%$.

Diante disso, pode-se verificar que pequenas variações na porosidade total afetam significativamente a recuperação do produto.

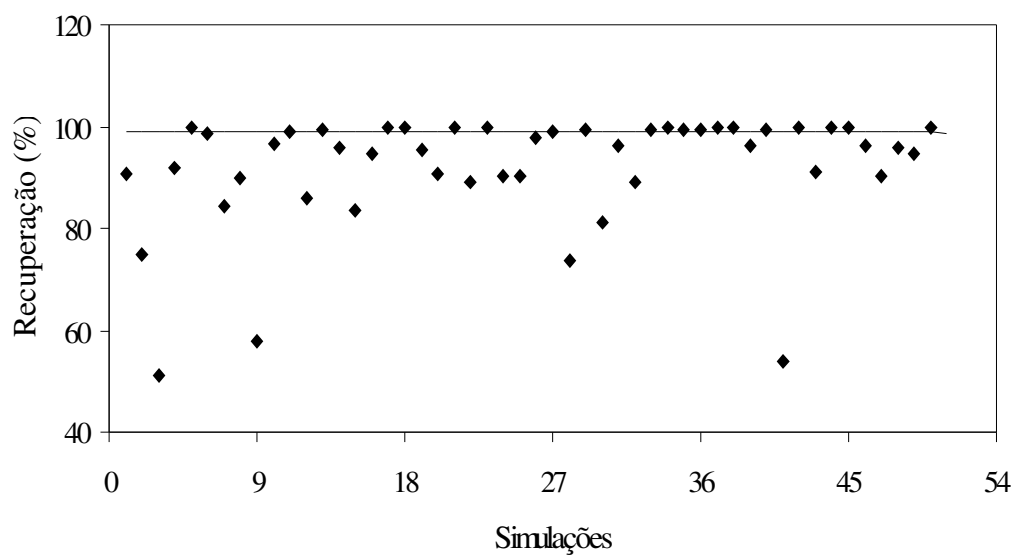


Figura 4.25: Recuperação do enantiômero S-(-)-omeprazol considerando variações de 1% na porosidade total.

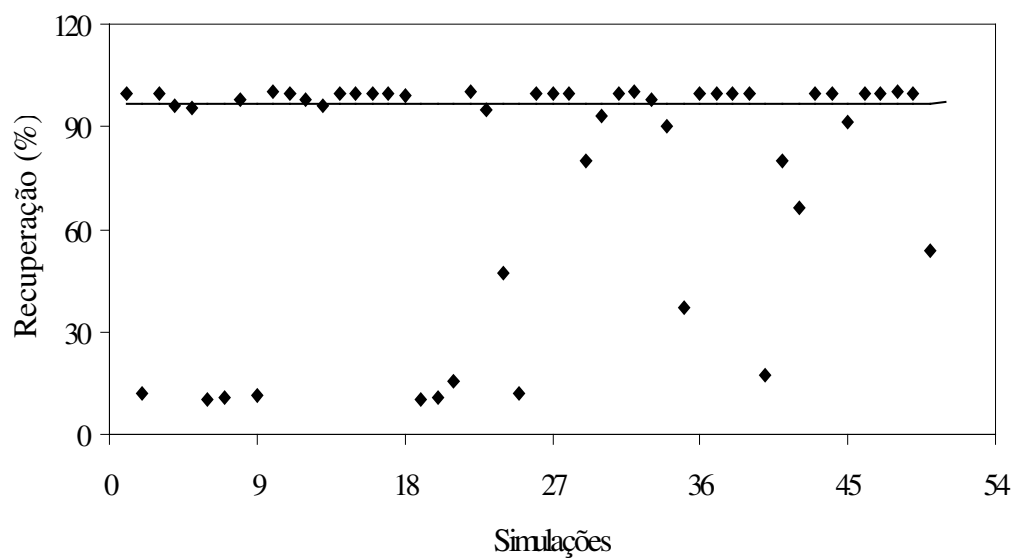


Figura 4.26: Recuperação do enantiômero S-(-)-omeprazol considerando variações de 3% na porosidade total.

4.4 AVALIAÇÃO DOS COEFICIENTES DE DISPERSÃO AXIAL E DE TRANSFERÊNCIA DE MASSA

Nas Tabelas 4.6 e 4.7 são apresentados os valores do número de pratos (N), em diferentes temperaturas e vazões da FM, para o TTBB (coluna SP5) e os enantiômeros do omeprazol (coluna SP1), respectivamente.

Tabela 4.6: Número de pratos em diferentes temperaturas e vazões da FM para o TTBB.

Q (mL/min)	Temperatura (°C)		
	25	35	50
1,0	3523	3722	4014
2,0	2798	2974	3205
3,0	2362	2397	2592
4,0	1986	2098	2160

Tabela 4.7: Número de pratos em diferentes temperaturas e vazões para os enantiômeros do omeprazol.

Q (mL/min)	Temperatura (°C)			
	25	30	40	50
S-(-)-omeprazol				
1,0	1764	1955	2961	3339
2,0	1328	1386	1898	2315
3,0	1077	1146	1505	1790
4,0	918	922	1135	1306
R-(+)-omeprazol				
1,0	1060	1159	1842	2127
2,0	742	791	1075	1457
3,0	577	626	851	1117
4,0	483	513	654	806

Pode-se observar um aumento nos valores de N com a elevação da temperatura a uma vazão da FM constante. No entanto, estes valores decrescem quando a temperatura é mantida constante e a vazão da FM varia de 1,0 para 4,0 mL/min. Nos dois casos o tempo de retenção diminuiu com o aumento da temperatura e da vazão. No entanto, observou-se um decréscimo mais acentuado na largura da base do pico quando a temperatura foi mantida constante. O mesmo comportamento foi observado nas colunas SP5 e SP7.

As curvas de van Deemter para o TTBB, em diferentes temperaturas, são mostradas na Figura 4.27.

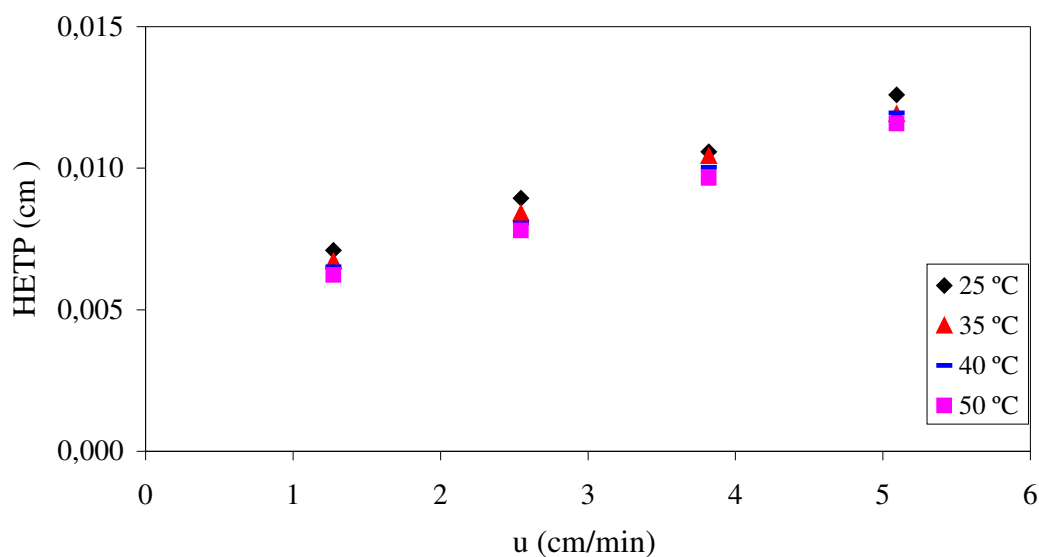


Figura 4.27: Gráfico de van Deemter para o TTBB. Coluna SP5. Condições experimentais: $C = 3,0$ mg/mL; FM = metanol (100%); $V_{\text{injeção}} = 20$ μL ; $Q = 1,0, 2,0, 3,0$ e $4,0$ mL/min; $\lambda = 254$ nm.

Uma vez que o TTBB penetra rapidamente na FEQ, pode-se desprezar a influência da transferência de massa. Isto significa que o coeficiente de transferência de massa (k_m) apresenta uma elevada ordem de magnitude. Por outro lado, sabe-se também que o TTBB não é adsorvido na FEQ ($H = 0$). Diante de tais considerações, os valores de $HETP$ para o TTBB devem ser constantes e independentes da velocidade superficial da FM. Desta forma, o segundo termo da Equação 2.19 é considerado igual a zero (WANG; CHING, 2002).

No entanto, as curvas de van Deemter para o TTBB apresentaram uma pequena variação com o aumento da vazão da fase móvel, provavelmente ocasionada pelos efeitos

de resistência à transferência de massa. Neste caso, o segundo termo da Equação 2.19 não pode ser considerado igual a zero.

Na Tabela 4.8 são apresentados os valores do coeficiente de transferência de massa para o TTBB.

Tabela 4.8: Coeficiente de transferência de massa para o TTBB.

	25 °C	35 °C	40 °C	50 °C
k_m (min ⁻¹)	336 ± 11	352 ± 12	343 ± 12	354 ± 10

Coluna SP5. Condições experimentais: C = 3,0 mg/mL; FM = metanol (100%); $V_{\text{injeção}} = 20 \mu\text{L}$; Q = 1,0, 2,0, 3,0 e 4,0 mL/min; $\lambda = 254 \text{ nm}$.

As Figuras 4.28-31 mostram as curvas de van Deemter para os enantiômeros do omeprazol em diferentes temperaturas.

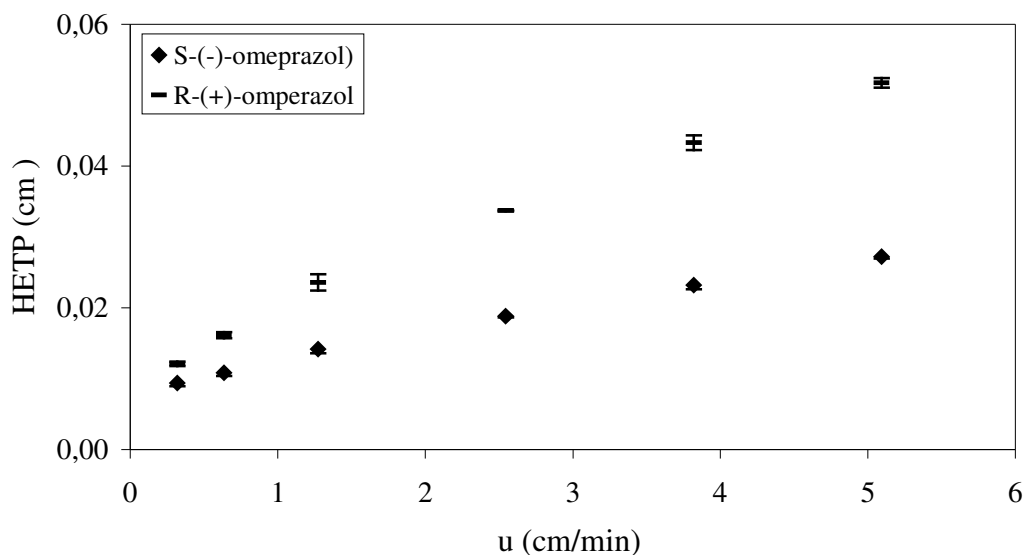


Figura 4.28: Gráfico de van Deemter para os enantiômeros do omeprazol. Coluna SP1. Condições experimentais: C = 0,1 mg/mL; T = 25 °C; FM = metanol (100%); $V_{\text{injeção}} = 20 \mu\text{L}$; Q = 1,0, 2,0, 3,0 e 4,0 mL/min; $\lambda = 302 \text{ nm}$.

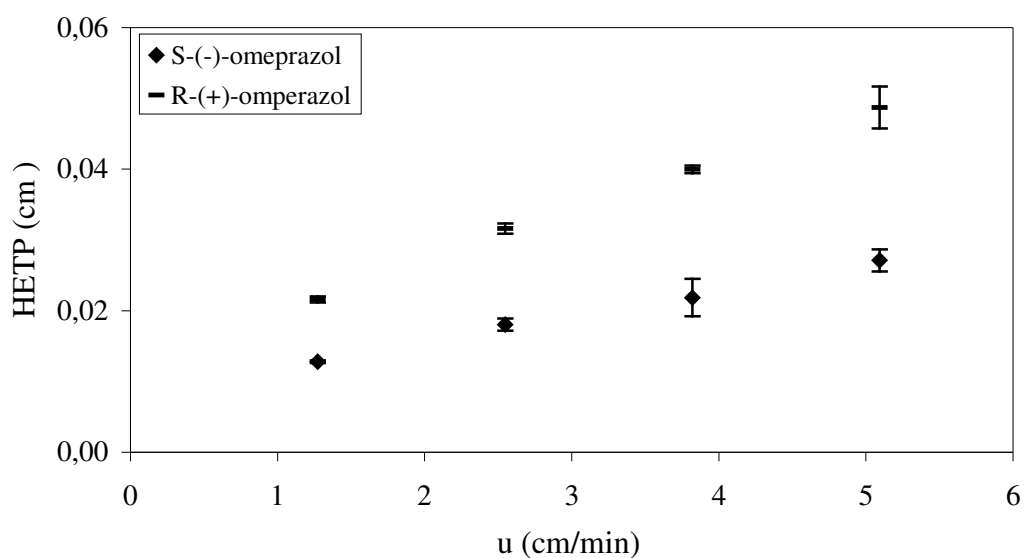


Figura 4.29: Gráfico de van Deemter para os enantiômeros do omeprazol. Coluna SP1. Condições experimentais: $C = 0,1$ mg/mL; $T = 30$ °C; FM = metanol (100%); $V_{\text{injeção}} = 20$ μL ; $Q = 1,0, 2,0, 3,0$ e $4,0$ mL/min; $\lambda = 302$ nm.

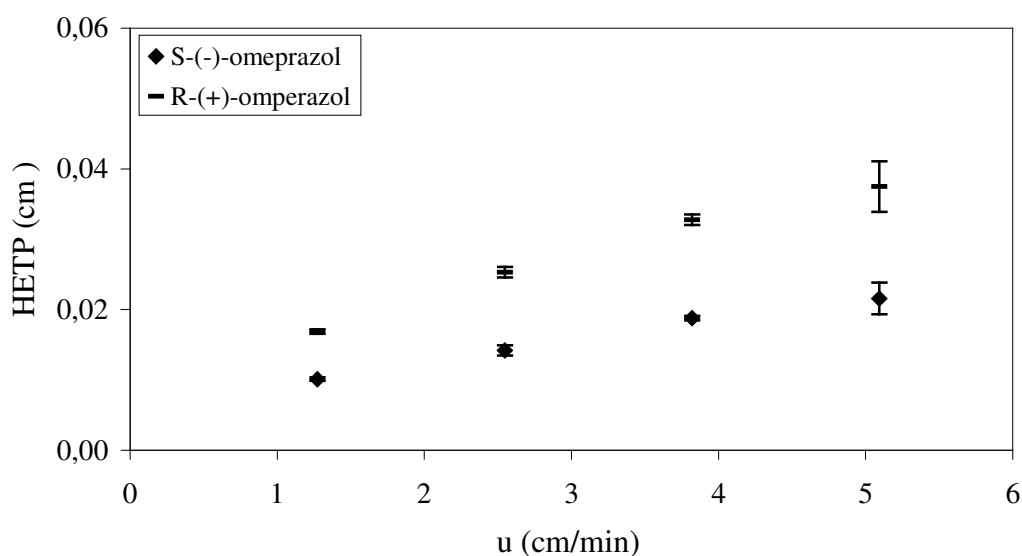


Figura 4.30: Gráfico de van Deemter para os enantiômeros do omeprazol. Coluna SP1. Condições experimentais: $C = 0,1$ mg/mL; $T = 40$ °C; FM = metanol (100%); $V_{\text{injeção}} = 20$ μL ; $Q = 1,0, 2,0, 3,0$ e $4,0$ mL/min; $\lambda = 302$ nm.

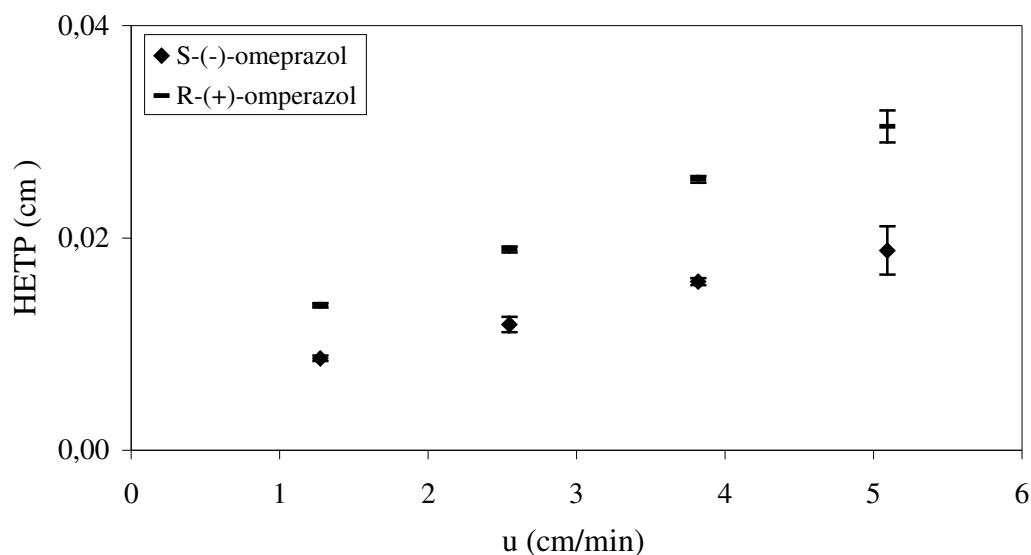


Figura 4.31: Gráfico de van Deemter para os enantiômeros do omeprazol. Coluna SP1. Condições experimentais: $C = 0,1$ mg/mL; $T = 50$ °C; FM = metanol (100%); $V_{\text{injeção}} = 20$ μ L; $Q = 1,0, 2,0, 3,0$ e $4,0$ mL/min; $\lambda = 302$ nm.

Pode-se observar, em todas as figuras apresentadas, uma relação linear entre a altura equivalente a um prato teórico e a velocidade superficial da fase móvel. O mesmo comportamento foi observado nas colunas SP5 e SP7.

Os gráficos também mostram a ausência de um ponto de mínimo nas curvas de van Deemter, embora experimentos tenham sido realizados a vazões inferiores a $1,0$ mL/min ($0,25$ e $0,50$ mL/min) na temperatura de 25 °C. Devido ao elevado tempo de análise e consumo de solvente não foram realizadas injeções utilizando vazões inferiores a $0,25$ mL/min.

A inexistência de um valor mínimo no gráfico *HETP versus u* indica que o termo B da equação de van Deemter, o qual está relacionado aos efeitos de difusão molecular, pode ser desprezado na faixa de vazão analisada, e a eficiência da coluna é influenciada apenas pelos efeitos de dispersão axial e de transferência de massa.

Na Tabela 4.9 são apresentados os valores dos coeficientes de dispersão axial e de transferência de massa, para os enantiômeros do omeprazol, na coluna SP1.

Tabela 4.9: Coeficientes de dispersão axial e de transferência de massa para os enantiômeros do omeprazol.

	25 °C	30 °C	40 °C	50 °C
S(-)-omeprazol				
$D_L/u \cdot 10^3$ (cm ² ·min ⁻¹)	5,0 ± 0,2	4,1 ± 0,5	2,0 ± 0,4	1,7 ± 0,4
k_m (min ⁻¹)	66 ± 3	66 ± 5	65 ± 6	87 ± 6
R-(+)-omeprazol				
$D_L/u \cdot 10^3$ (cm ² ·min ⁻¹)	7,3 ± 0,4	6,5 ± 0,5	3,0 ± 0,7	2,4 ± 0,8
k_m (min ⁻¹)	25 ± 1	28 ± 1	31 ± 3	47 ± 3

Coluna SP1. Condições experimentais: C = 0,1 mg/mL; FM = metanol (100%); $V_{\text{injeção}} = 20 \mu\text{L}$; Q = 1,0, 2,0, 3,0 e 4,0 mL/min; $\lambda = 302 \text{ nm}$.

Como substâncias quirais apresentam propriedades físico-químicas idênticas e a dispersão axial em separações enantioméricas é determinada pela vazão e não pela difusão molecular, tal coeficiente de dispersão deveria ser aproximadamente o mesmo para os dois enantiômeros (DUAN; CHING; SWARUP, 1998; WANG; CHING, 2002). No entanto, a Tabela 4.9 mostra uma variação deste coeficiente entre os enantiômeros estudados neste trabalho. Alguns autores atribuíram esse comportamento a erros experimentais (DUAN; CHING; SWARUP, 1998; WANG; CHING, 2002) e outros autores à distribuição do tamanho de partícula da FEQ e a irregularidade das mesmas (JACOBSON; SEIDEL-MORGENSTERN; GUIOCHON, 1993).

Os valores de k_m diferem para cada enantiômero provavelmente devido à cinética do processo de adsorção-dessorção. Os valores mais elevados foram apresentados pelo enantiômero S(-). Resultados similares foram encontrados por DUAN; CHING; SWARUP, 1998 e WANG; CHING, 2002.

A Tabela 4.10 mostra, para efeitos comparativos, os valores dos coeficientes de dispersão axial e de transferência de massa global obtidos por ROSA (2005) no estudo da separação cromatográfica dos enantiômeros do omeprazol na FEQ (O,O'-bis[4-terc-butilbenzoi]l-N,N'-dialil-L-tartardiamida) (Kromasil® CHI-TBB). Os valores de D_L e k_m são inferiores aos valores encontrados neste trabalho, o que indica que a coluna baseada em

tartardiamida tem uma menor influência da dispersão axial sobre o perfil de eluição dos enantiômeros e uma maior resistência à transferência de massa.

Tabela 4.10: Coeficientes de dispersão axial e de transferência de massa para os enantiômeros do omeprazol (ROSA, 2005).

	20 °C	25 °C	30 °C	40 °C
S-(-)-omeprazol				
$D_L \cdot 10^3$ (cm ² .min ⁻¹)	0,94u	0,85u	0,80u	0,60u
k_m (min ⁻¹)	13,66	15,21	17,15	21,03
R-(+)-omeprazol				
$D_L \cdot 10^3$ (cm ² .min ⁻¹)	0,96u	0,89u	0,83u	0,62u
k_m (min ⁻¹)	9,35	12,16	14,31	17,83

4.5 AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO TERMODINÂMICO DA ADSORÇÃO

4.5.1 Constantes de Henry

As Figuras 4.32 e 4.33 exibem as constantes de Henry dos enantiômeros em função da temperatura, obtidas na coluna SP7.

Os resultados mostraram um decréscimo nos valores de H com a elevação da temperatura devido a uma aproximação das bandas cromatográficas. O aumento da temperatura diminui a viscosidade da fase móvel, diminuindo assim os tempos de retenção dos enantiômeros e a sua interação com a FEQ. O mesmo comportamento foi observado nas colunas SP1 e SP5.

Nas Figuras 4.34 e 4.35 são apresentadas as constantes de Henry dos enantiômeros menos (S-(-)-omeprazol) e mais retido (R-(+)-omeprazol), respectivamente, em cada coluna. As barras verticais representam o intervalo de confiança do valor médio dessas constantes calculadas pelo teste t.

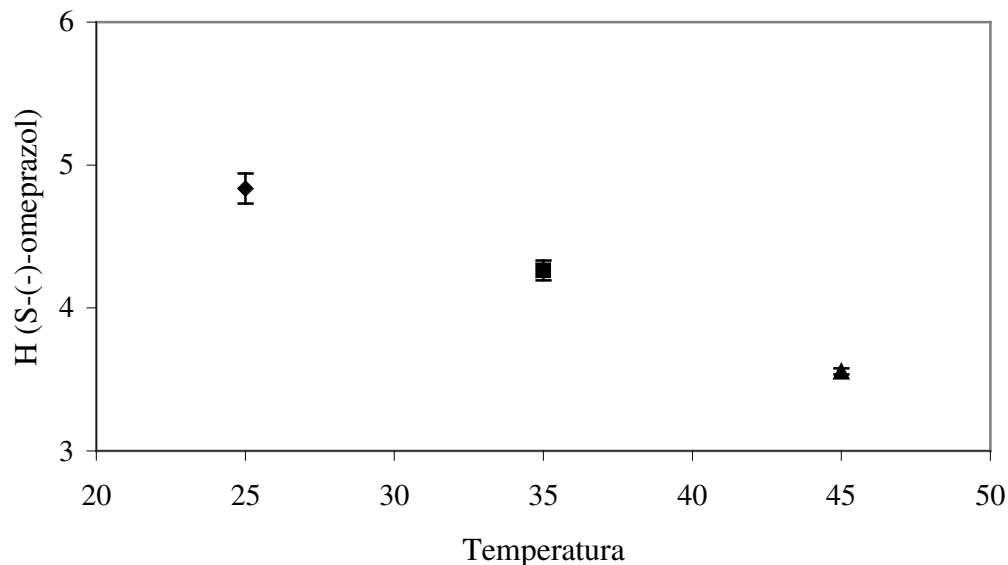


Figura 4.32: Constantes de Henry do S-(-)-omeprazol em função da temperatura e seus respectivos intervalos de confiança. Coluna SP7. Condições experimentais: $Q = 3,0$ mL/min; $C = 0,1$ mg/mL; FM = metanol (100%); $V_{\text{injeção}} = 20$ μ L; $\lambda = 302$ nm.

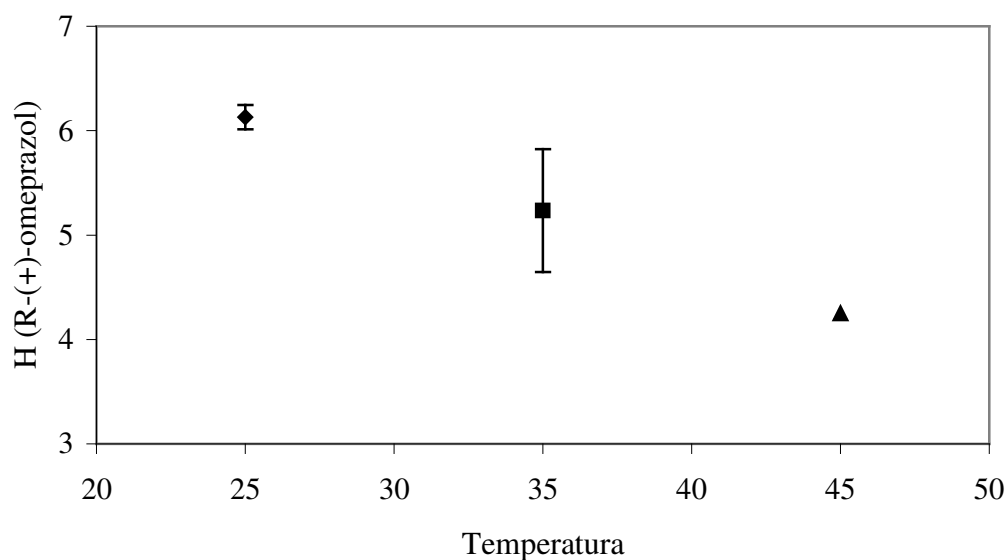


Figura 4.33: Constantes de Henry do R-(+)-omeprazol em função da temperatura e seus respectivos intervalos de confiança. Coluna SP7. Condições experimentais: $Q = 3,0$ mL/min; $C = 0,1$ mg/mL; FM = metanol (100%); $V_{\text{injeção}} = 20$ μ L; $\lambda = 302$ nm.

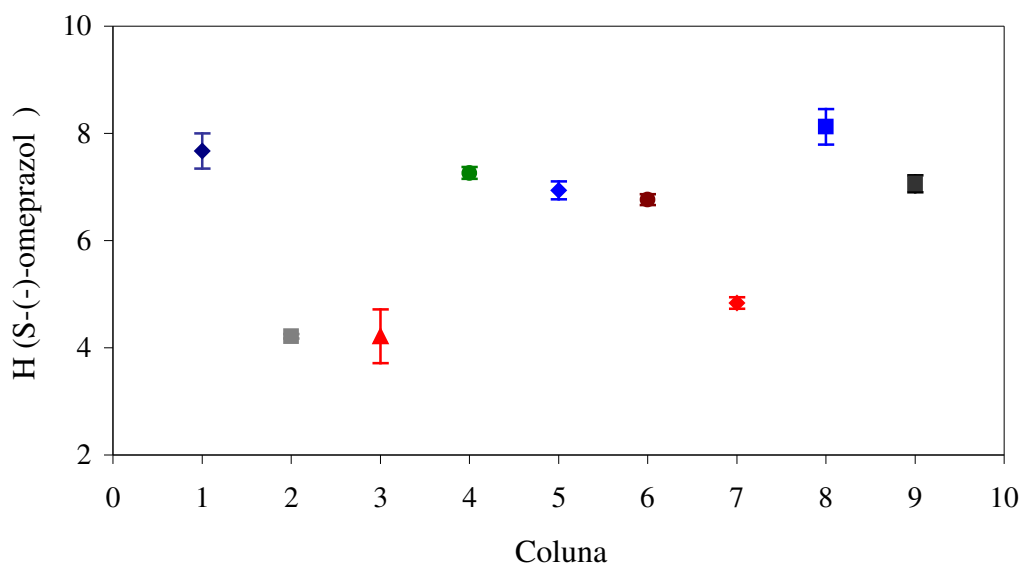


Figura 4.34: Constantes de Henry do S-(-)-omeprazol e seus respectivos intervalos de confiança em cada coluna. Condições experimentais: T = 25 °C; Q = 3,0 mL/min; C = 0,1 mg/mL; FM = metanol (100%); $V_{\text{injeção}} = 20 \mu\text{L}$; $\lambda = 302 \text{ nm}$.

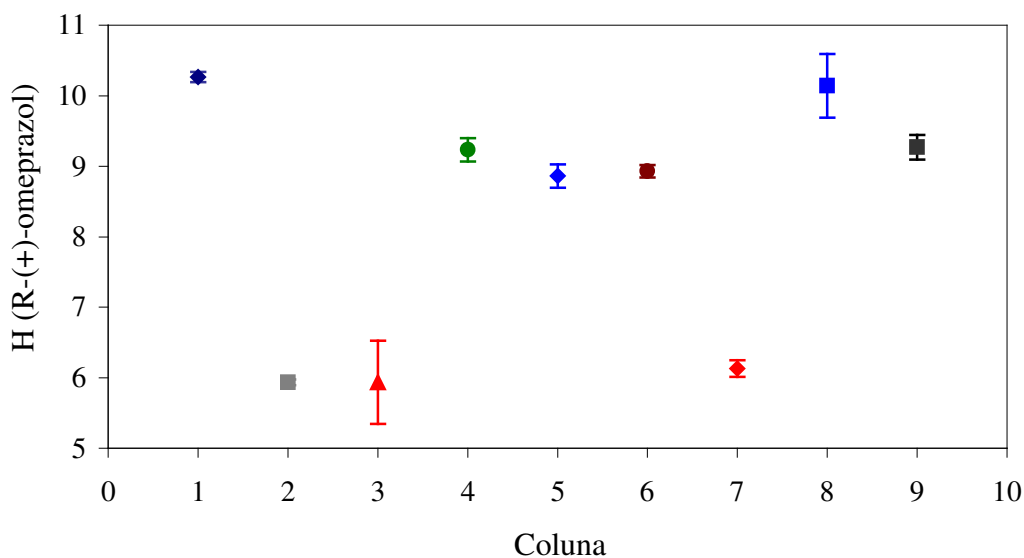


Figura 4.35: Constantes de Henry do R-(+)-omeprazol e seus respectivos intervalos de confiança em cada coluna. Condições experimentais: T = 25 °C; Q = 3,0 mL/min; C = 0,1 mg/mL; FM = metanol (100%); $V_{\text{injeção}} = 20 \mu\text{L}$; $\lambda = 302 \text{ nm}$.

Os resultados apresentados (Figuras 4.32 e 4.33), referentes a análise das constantes de Henry, seguem o mesmo raciocínio das porosidades já discutido

anteriormente. As Figuras 4.34 e 4.35 mostram que apenas algumas colunas possuem constantes de Henry estatisticamente equivalentes a 95% de confiança.

O teste F também foi realizado entre as variâncias das constantes de Henry de cada enantiômero, com o objetivo de avaliar se os erros experimentais cometidos na obtenção dessas constantes em cada coluna são equivalentes ou não. A análise é mostrada nas Figuras 4.36 e 4.37.

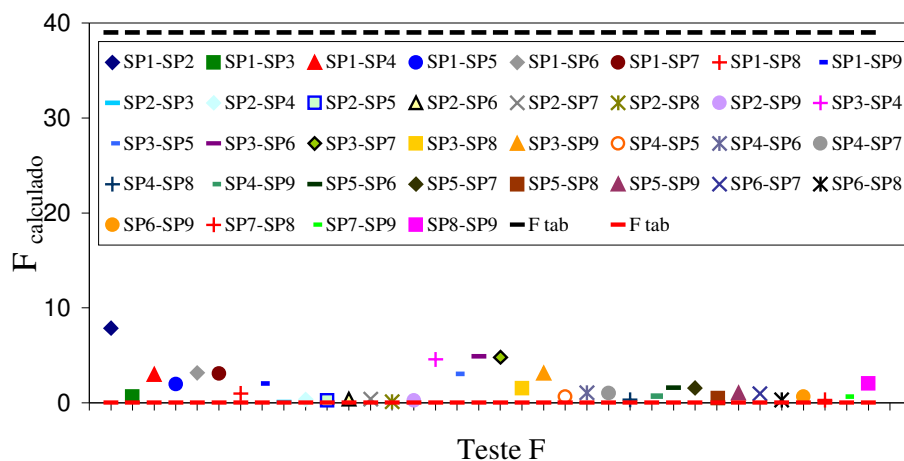


Figura 4.36: Valores do teste F entre as variâncias das constantes de Henry do enantiômero menos retido de cada coluna. Condições experimentais: $T = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$; $Q = 3,0\text{ mL/min}$; $C = 3,0\text{ mg/mL}$; FM = metanol (100%); $V_{\text{injeção}} = 20\text{ }\mu\text{L}$; $\lambda = 302\text{ nm}$.

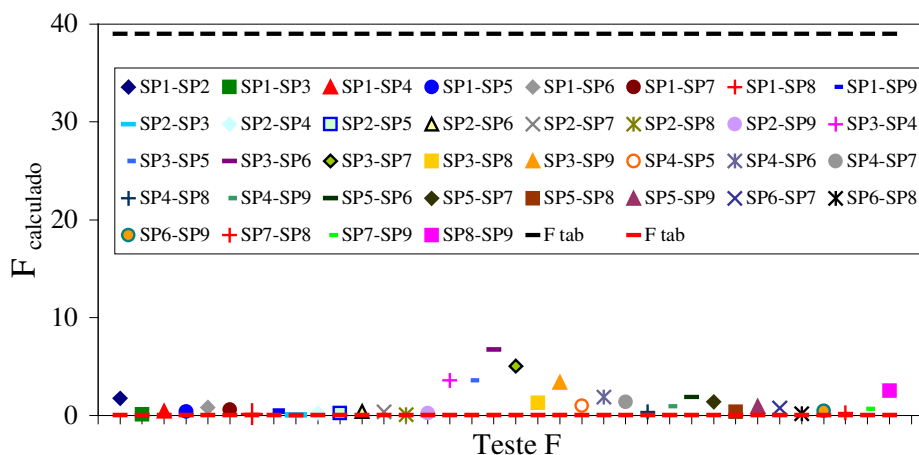


Figura 4.37: Valores do teste F entre as variâncias das constantes de Henry do enantiômero mais retido de cada coluna. Condições experimentais: $T = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$; $Q = 3,0\text{ mL/min}$; $C = 3,0\text{ mg/mL}$; FM = metanol (100%); $V_{\text{injeção}} = 20\text{ }\mu\text{L}$; $\lambda = 302\text{ nm}$.

Os resultados mostraram mais uma vez que erros cometidos ao determinar as constantes de Henry são equivalentes entre cada uma das colunas, embora os valores das constantes não sejam.

A Tabela 4.11 mostra as constantes de Henry determinadas a partir da porosidade total e dos tempos de retenção dos enantiômeros e do TTBB, de acordo com a Equação 3.4.

Tabela 4.11: Constantes de Henry.

Coluna	H (S-(-)-omeprazol)	H (R-(+)-omeprazol)
SP1	$7,8 \pm 0,3$	$10,27 \pm 0,07$
SP2	$4,21 \pm 0,04$	$5,93 \pm 0,04$
SP3	$6,3 \pm 0,5$	$8,7 \pm 0,6$
SP4	$7,3 \pm 0,1$	$9,2 \pm 0,2$
SP5	$6,9 \pm 0,2$	$8,9 \pm 0,2$
SP6	$6,8 \pm 0,1$	$8,9 \pm 0,1$
SP7	$4,8 \pm 0,1$	$6,1 \pm 0,1$
SP8	$8,1 \pm 0,3$	$10,1 \pm 0,4$
SP9	$7,1 \pm 0,2$	$9,3 \pm 0,2$

Condições experimentais: C = 0,1 mg/mL; T = 25 °C; FM = metanol (100%); $V_{\text{injeção}} = 20 \mu\text{L}$; Q = 3,0 mL/min; $\lambda = 302 \text{ nm}$.

Os valores mais elevados para o R-(+)-omeprazol indicam uma maior afinidade da fase estacionária por esse enantiômero do que pelo enantiômero S-(-)-omeprazol. Além disso, pequenas variações nas porosidades, devido ao método de empacotamento, implicam em grandes variações das constantes de Henry, cujos valores variaram aproximadamente 100% entre algumas colunas.

4.5.2 Influência da temperatura

A Figura 4.38 mostra o perfil de eluição dos enantiômeros do omeprazol na coluna SP1 em diferentes temperaturas e vazões da fase móvel.

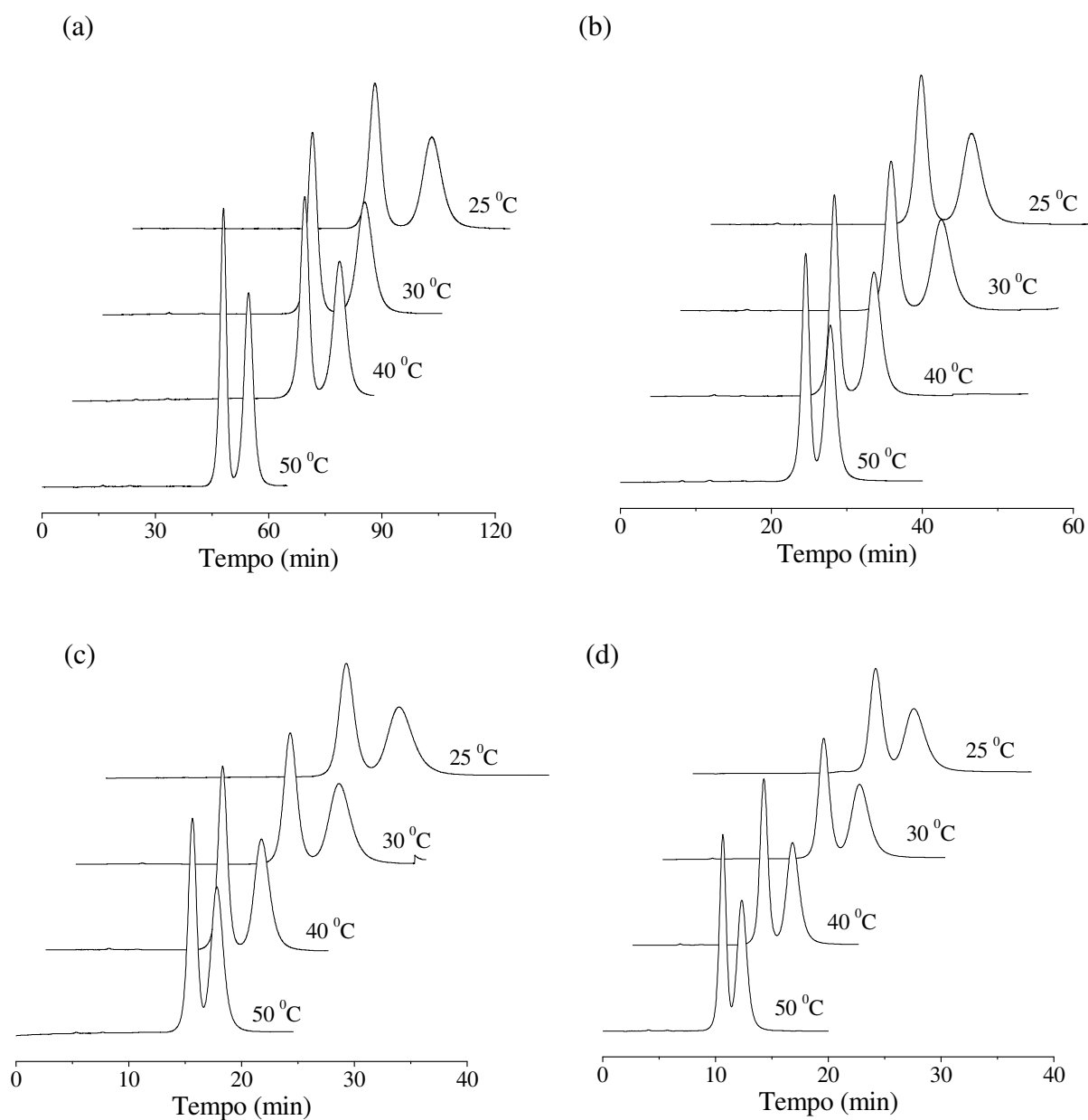


Figura 4.38: Perfil de eluição dos enantiômeros do omeprazol. Coluna SP1. Condições experimentais: $C = 0,1 \text{ mg/mL}$; FM = metanol (100%); $V_{\text{injeção}} = 20 \text{ }\mu\text{L}$; $\lambda = 302 \text{ nm}$. (a) $Q = 1,0 \text{ mL/min}$, (b) $Q = 2,0 \text{ mL/min}$, (c) $Q = 3,0 \text{ mL/min}$ e (d) $Q = 4,0 \text{ mL/min}$.

Os parâmetros cromatográficos dos enantiômeros do omeprazol obtidos na coluna SP1, em diferentes temperaturas e vazões da FM, são mostrados nas Tabelas 4.12-15.

Tabela 4.12: Parâmetros cromatográficos a 1,0 mL/min.

T (°C)	$k_{S-(-)}$	$k_{R-(+)}$	α	R_s
25	3,72	5,01	1,35	1,83 ± 0,02
30	3,30	4,37	1,32	1,91 ± 0,03
40	3,27	4,25	1,30	1,96 ± 0,03
50	2,71	3,22	1,19	1,59 ± 0,05

Tabela 4.13: Parâmetros cromatográficos a 2,0 mL/min.

T (°C)	$k_{S-(-)}$	$k_{R-(+)}$	α	R_s
25	3,56	4,96	1,39	1,50 ± 0,02
30	3,26	4,28	1,31	1,63 ± 0,05
40	2,94	3,55	1,22	1,75 ± 0,01
50	2,80	3,31	1,18	1,28 ± 0,01

Tabela 4.14: Parâmetros cromatográficos a 3,0 mL/min.

T (°C)	$k_{S-(-)}$	$k_{R-(+)}$	α	R_s
25	3,63	4,85	1,34	1,31 ± 0,01
30	3,32	4,31	1,30	1,33 ± 0,01
40	2,67	3,46	1,30	1,55 ± 0,05
50	2,65	3,15	1,19	1,17 ± 0,02

Tabela 4.15: Parâmetros cromatográficos a 4,0 mL/min.

T (°C)	$k_{S-(-)}$	$k_{R-(+)}$	α	R_s
25	3,67	4,80	1,31	1,16 ± 0,02
30	3,31	4,27	1,29	1,24 ± 0,02
40	2,50	3,28	1,31	1,40 ± 0,02
50	2,23	2,77	1,24	1,2 ± 0,1

O fator de separação diminuiu com a elevação da temperatura, a uma vazão constante, devido à redução da viscosidade da FM e conseqüentemente a menor interação dos enantiômeros com a FEQ. De acordo com OKAMOTO; KAIDA (1994), a separação completa de enantiômeros em colunas quirais ocorre quando $\alpha = 1,20$. Processos de separação em leito móvel simulado usualmente operam com fatores de separação entre 1,3 e 2,0 (SCHMIDT-TRAUB, 2005).

No entanto, o fator de separação não engloba informações sobre a largura das bandas. Neste caso, a resolução, parâmetro analítico calculado a partir da razão entre a distância que separa os pontos máximos das bandas cromatográficas e a média das larguras de suas respectivas bases, deve ser levada em consideração para avaliar a separação dos enantiômeros.

De acordo com os valores apresentados nas Tabelas 4.12-15, pode-se observar que R_s diminuiu com o aumento da vazão de FM e apresentou valores entre 1,16 e 1,96. Segundo COLLINS (2006), quando $R_s=1$, as duas bandas são razoavelmente separadas com somente 2% de superposição. Maiores valores de resolução indicam melhor separação: $R_s=1,25$ é suficiente para fins quantitativos e $R_s>1,5$ indica separação completa. Além disso, R_s apresentou um valor máximo a 40 °C em todas as vazões. Resultados similares de máxima resolução foram encontrados por PÉTER; VÉKES; ARMSTRONG (2002) e ZHAO; PRITTS (2007). ZHAO; PRITTS (2007) atribuíram tal comportamento a diferente influência da temperatura sobre os tipos de interações existentes entre os enantiômeros e a FEQ.

Na Tabela 4.16 são apresentados os valores de α e R_s , reportados na literatura, referentes à separação enantiomérica do omeprazol.

As Figuras 4.39 e 4.40 mostram a influência da temperatura sobre os fatores de retenção e separação dos enantiômeros do omeprazol na coluna SP1, reportados pelo gráfico de van't Hoff.

Tabela 4.16: Parâmetros cromatográficos encontrados na literatura referentes à separação enantiomérica do omeprazol.

Literatura	Coluna	α	R_s
BÁLMER; PERSSON; LAGERSTRÖM (1994)	Chiralpak AD (25 x 0,46 cm D.I.)	1,81 ^a	NF
BONATO et al. (2002)	Chiralpak AD (25 x 0,46 cm D.I.)	1,59 ^b	NF
CASS; DEGANI; CASSIANO (2000)	Tris(3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose (APS-Hypersil 5 μ m, 120Å) (15 x 0,46 cm D.I.)	1,47 ^c	3,18
		1,46 ^d	1,38
		2,01 ^e	4,18
COIMBRA (2007)	Tris(3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose (APS-Nucleosil 7 μ m, 500Å) (15 x 0,46 cm D.I.)	1,60 ^f	2,39
DEGANI (2001)	Tris(3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose (APS-Hypersil 5 μ m, 120Å) (15 x 0,46 cm D.I.)	1,67 ^g	3,73
DEL NOZAL et al. (2004)	Chiralpak AD (25 x 0,46 cm D.I.)	2,85 ^h	11,40
ERLANDSSON et al. (1990)	Trisfenilcarbamoilcelulose (10 x 0,21 cm D.I.)	1,30 ⁱ	0,69
ROSA (2005)	Kromasil CHI-TBB (25 x 1,0 cm D.I.)	1,31 ^j	4,49
TORIBIO et al. (2006)	Chiralpak AD (25 x 0,46 cm D.I.)	NF ^k	9,9
WEI; SHEN; CHEN (2006)	Trisfenilcarbamato de celulose (20 x 0,46 cm D.I.)	1,49 ^l	1,97

NF = não fornecido. ^aFM = Hexano-Etanol (80:20 v/v); ^bFM = Hexano-Etanol (40:60 v/v); ^cFM = Hexano-Etanol (70:30 v/v); ^dFM = Acetonitrila-Água (70:30 v/v); ^eFM = Etanol-Metanol (10:290 v/v); ^fFM = Hexano-Etanol (90:10 v/v); ^gFM = Hexano-Etanol (80:20 v/v); ^hFM = CO₂ supercrítico-35% Metanol; ⁱFM = Hexano-2-Propanol-Dietilamina (80:20:0,1 v/v/v); ^jFM = Hexano-2-Propanol-Trietilamina-Ácido acético (92:8:1,5:0,5 v/v/v/v); ^kFM = CO₂ supercrítico-30% Metanol; ^lFM = Hexano-Etanol (80:20 v/v).

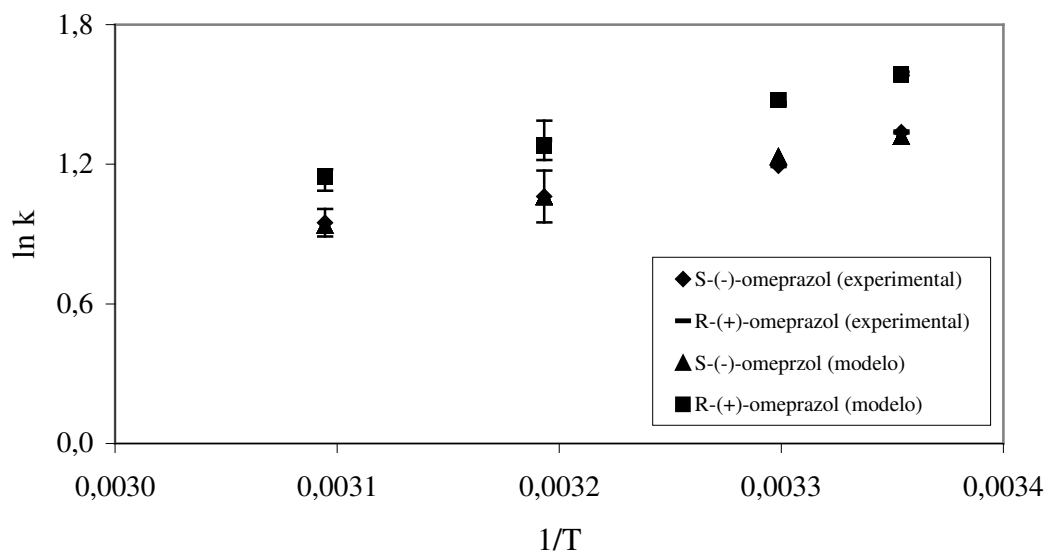


Figura 4.39: Gráfico semi-logarítmico do fator de retenção em função da temperatura. Coluna SP1. $C = 0,1$ mg/mL; $T = 25, 30, 40$ e 50 °C; FM = metanol (100%); $V_{\text{injeção}} = 20$ μL ; $\lambda = 302$ nm.

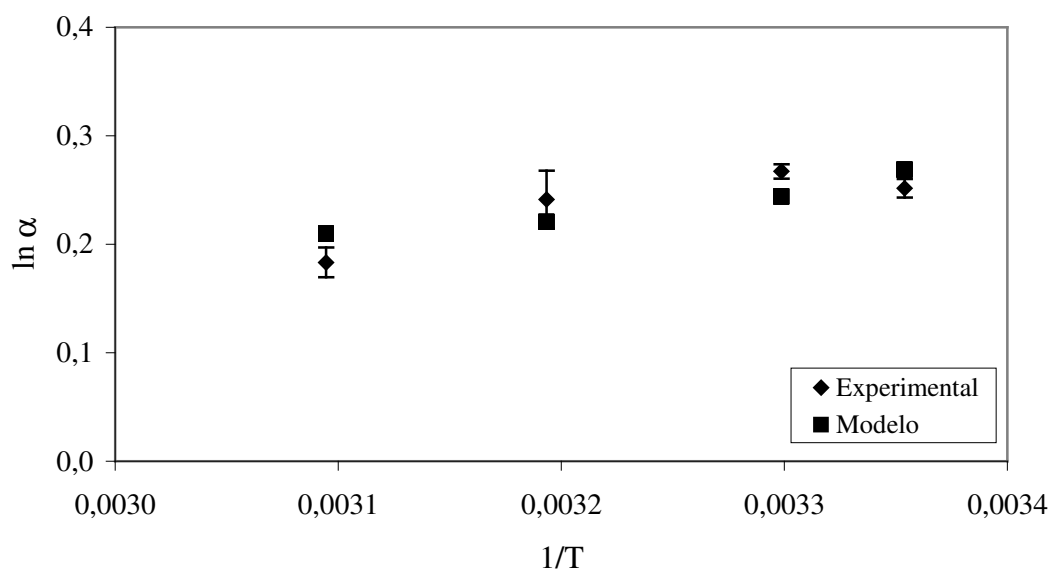


Figura 4.40: Gráfico semi-logarítmico do fator de separação em função da temperatura. Coluna SP1. $C = 0,1$ mg/mL; $T = 25, 30, 40$ e 50 °C; FM = metanol (100%); $V_{\text{injeção}} = 20$ μL ; $\lambda = 302$ nm.

Os gráficos de van't Hoff apresentaram um comportamento linear entre o logaritmo natural dos fatores de retenção e separação e o inverso da temperatura. Tal comportamento demonstra que a FEQ não sofre mudanças de conformação no intervalo de temperatura considerado. Neste caso, o mecanismo de reconhecimento quiral não é afetado pelo aumento da temperatura e os parâmetros termodinâmicos ΔH^0 e $\Delta\Delta H^0$ são independentes da mesma (BOOTH; WAINER, 1996; COLE; DORSEY, 1992; GOSENS et al., 2004; PÉTER et al., 1998; ROJKOVICOVÁ et al., 2004; WANG et al., 2002; ZABKA; RODRIGUES, 2007). Além disso, os fatores de retenção e separação dos enantiômeros decresceram com o aumento da temperatura da coluna. Tal comportamento pode ser atribuído ao fato de que os enantiômeros, em nível molecular, têm uma menor interação com a FEQ com a elevação da temperatura e por isso migram mais rápido através da coluna (CABUSAS, 1998; ZABKA; RODRIGUES, 2007). Resultados similares foram obtidos com as colunas SP5 e SP7. Os valores de ΔH^0 e ΔS^0 (coluna SP1), determinados da inclinação e interseção do gráfico $\ln k$ versus $1/T$, e os valores de $\Delta(\Delta H^0)$ e $\Delta(\Delta S^0)$, determinados da inclinação e interseção do gráfico $\ln \alpha$ versus $1/T$, são apresentados na Tabela 4.17.

Tabela 4.17: Parâmetros termodinâmicos (Coluna SP1).

E^*	ΔS ($J.mol^{-1}K^{-1}$)	ΔH ($kJ.mol^{-1}$)	R^2	$\Delta\Delta S$ ($J.mol^{-1}K^{-1}$)	$\Delta\Delta H$ ($kJ.mol^{-1}$)	R^2
S(-)	-36 ± 4	-16 ± 1	0,83	-4 ± 1	$-1,9 \pm 0,4$	0,57
R(+)	-40 ± 3	$-17,8 \pm 0,9$	0,92			

E^* = enantiômero.

Os valores negativos de ΔH^0 indicam que é energeticamente mais favorável o soluto estar adsorvido na FEQ do que em solução. (PÉTER et al., 1998; PÉTER; VÉKES; ARMSTRONG, 2002; TORÍBIO et al., 2006). Além disso, o valor deste parâmetro foi maior para o enantiômero R-(+) devido a sua maior interação com a FEQ. O mesmo comportamento para o enantiômero mais retido foi observado por outros autores (PÉTER et al., 1998; PÉTER; VÉKES; ARMSTRONG, 2002; ZABKA; RODRIGUES, 2007).

A variação de entropia está relacionada a variações de ordem-desordem de um sistema. Quanto mais randômico for o sistema, maior a sua entropia. Portanto, os valores negativos de ΔS^0 indicam que os enantiômeros do omeprazol encontram-se mais ordenados no estado adsorvido do que em solução.

A temperatura isoenantioseletiva foi 187 °C. Nesta temperatura não ocorre separação enantiomérica, os termos entálpicos e entrópicos são balanceados ($\alpha = 1$ e $\Delta(\Delta G^0) = 0$) e há inversão na ordem de eluição dos enantiômeros. No entanto, como todos os experimentos foram realizados em temperaturas inferiores a temperatura isoenantioseletiva, não houve inversão na ordem de eluição e o processo de separação é controlado por efeitos entálpicos, o que corrobora os valores de $\Delta(\Delta H^0)$ encontrados.

4.5.3 Influência da concentração de soluto

A Figura 4.41 mostra a curva da derivada do perfil de eluição e a curva de ruptura da frente de adsorção obtida para a mistura racêmica com concentração igual a 2,0 mg/mL.

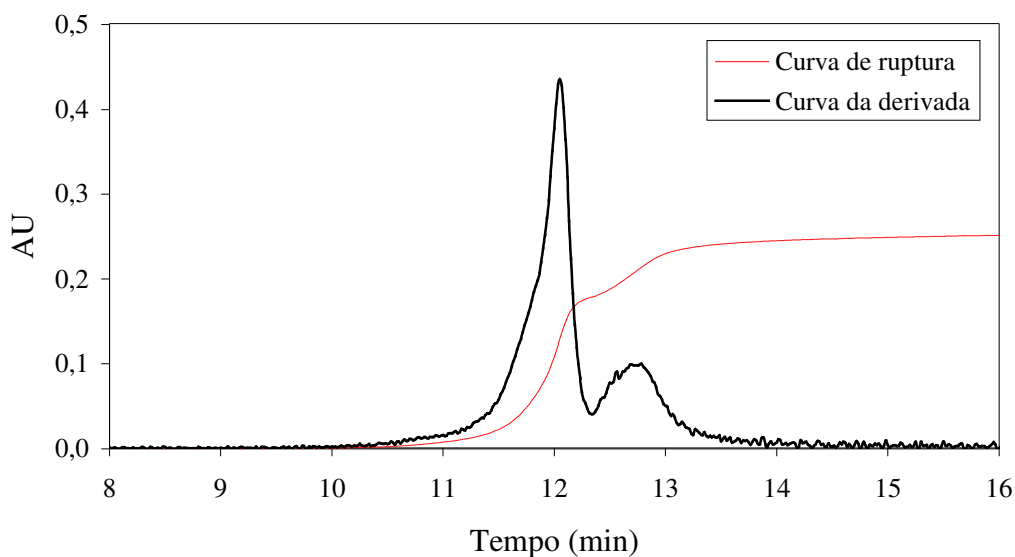


Figura 4.41: Curva da derivada do perfil de eluição e curva de ruptura da frente de adsorção. Coluna SP6. Condições experimentais: C = 2,0 mg/mL; T = 25 °C; FM = metanol (100%); Q = 2,0 mL/min; $\lambda = 350$ nm.

O primeiro e o segundo ponto de máximo da curva da derivada correspondem, respectivamente, aos volumes de retenção da primeira e segunda frente da curva de ruptura.

O ponto de mínimo da curva da derivada corresponde à concentração do enantiômero menos retido no platô intermediário. Durante a formação desse platô, apenas o enantiômero menos retido é detectado pelo sistema de análise. Tal fato pode ser comprovado pela Figura 4.42 que mostra as frações coletadas minuto a minuto, durante a eluição dos enantiômeros na etapa de adsorção da curva de ruptura.

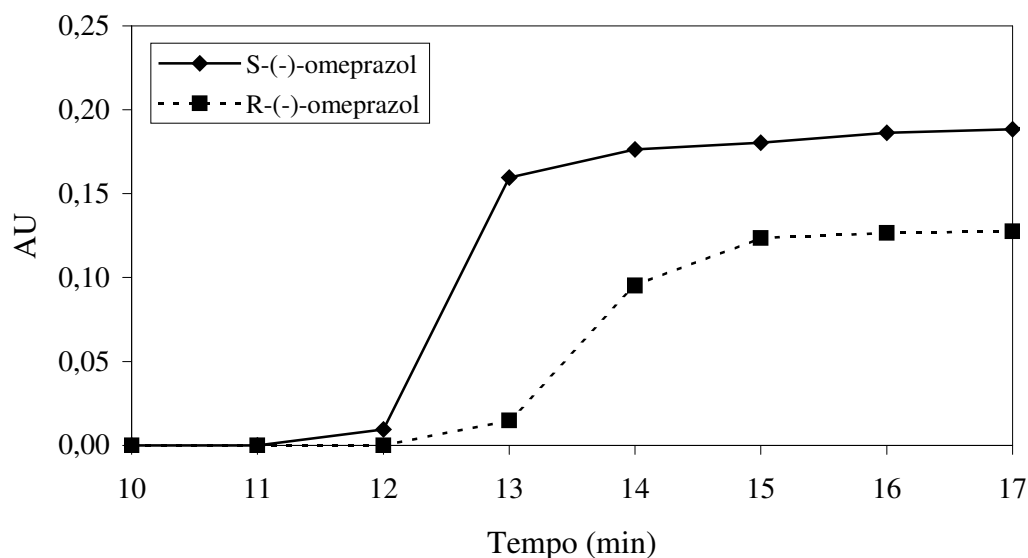


Figura 4.42: Frações coletadas. Coluna SP6. Condições experimentais: $T = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$; FM = metanol (100%); $V_{\text{injeção}} = 20\text{ }\mu\text{L}$; $Q = 2,0\text{ mL/min}$; $\lambda = 302\text{ nm}$.

Concentrações superiores a $4,0\text{ mg/mL}$ não foram injetadas na coluna cromatográfica devido à falta de detecção do platô intermediário decorrente do efeito de sobrecarga. Comportamento semelhante foi observado por ARNELL; FORSSÉN; FORNSTEDT (2005) e KOSTOVA; BART (2008).

A Figura 4.43 mostra o gráfico de Scatchard (q/c versus q) dos enantiômeros do omeprazol. Dado a sua linearidade, o modelo de Langmuir foi diretamente correlacionado aos dados experimentais.

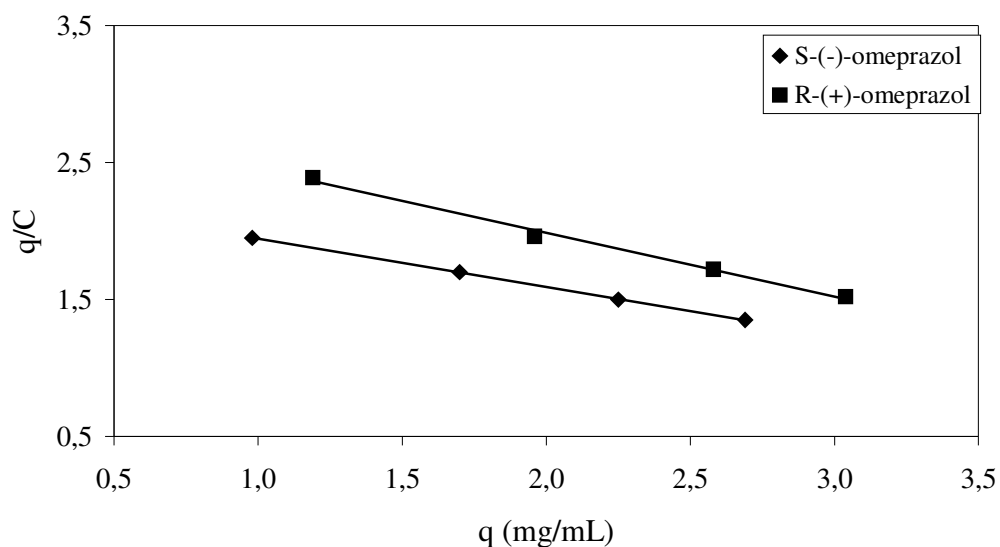


Figura 4.43: Gráfico de Scatchard dos enantiômeros do omeprazol.

As isotermas de adsorção dos enantiômeros do omeprazol a 25 °C, apresentadas na Figura 4.44, foram analisadas e validadas de acordo com a metodologia proposta por GRITTI; GUIOCHON (2005). O mesmo procedimento foi utilizado por CHERRAK; KHATTABI; GUIOCHON, (2000) e SAMUELSSON; SAJONZ; FORNSTEDT (2008).

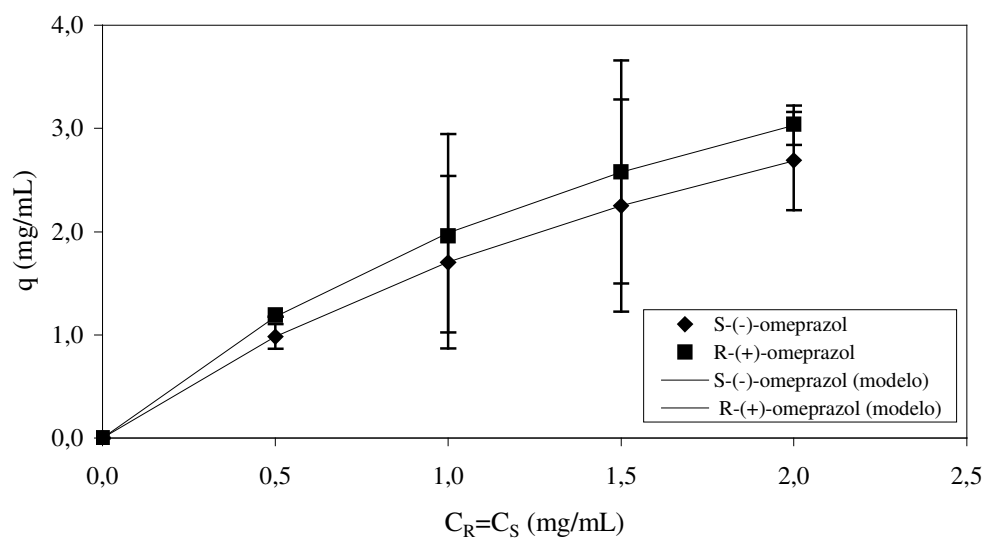


Figura 4.44: Isotermas de adsorção dos enantiômeros do omeprazol obtidas pelo método da análise frontal. Coluna SP6; $C = 1,0, 2,0 3,0$ e $4,0$ mg/mL; $T = 25$ °C; FM = metanol (100%); $Q = 2,0$ mL/min; $\lambda = 350$ nm.

Os parâmetros do modelo de Langmuir, constantes de equilíbrio (a e b) e capacidade de saturação da fase estacionária (q_s), estão apresentados na Tabela 4.18.

Tabela 4.18: Parâmetros do modelo de Langmuir.

	a	b (mL/mg)	q_s (mg/mL)	R^2
S-(-)-omeprazol	$2,33 \pm 0,08$	$0,368 \pm 0,007$	$6,33 \pm 0,08$	1,00
R-(+)-omeprazol	$2,9 \pm 0,2$	$0,45 \pm 0,02$	$6,4 \pm 0,2$	1,00

A capacidade de saturação da FEQ sintetizada e utilizada neste trabalho é relativamente inferior à capacidade de saturação da mesma FEQ comercial Chiralpak AD, conforme dados reportados na literatura (23,60-177,90 g/L) (MIHLBACHLER et al., 2002b, 2006; MIHLBACHLER; SEIDEL-MORGENSTERN; GUIOCHON, 2004; RIBEIRO et al., 2008; ZABKA; RODRIGUES, 2008). A diferença entre os valores de q_s , obtidos nesse trabalho e os reportados na literatura, está provavelmente relacionada à derivação dos grupos hidroxila da amilose e à obtenção de um derivado de uréia, durante a reação de síntese do carbamato, e ao processo de recobrimento do suporte cromatográfico (partículas agregadas e obstrução dos poros), conforme discutido em seções anteriores.

4.6 AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE DISCRIMINAÇÃO QUIRAL DA FASE ESTACIONÁRIA EM FUNÇÃO DO TEMPO DE UTILIZAÇÃO DA COLUNA

Os valores dos parâmetros cromatográficos, R_s e α , obtidos após consecutivas injeções do TTBB e da mistura racêmica na coluna SP5 são apresentados na Tabela 4.19.

Tabela 4.19: Parâmetros cromatográficos.

	P1	P2	P3	P4
R_s	1,02	0,97	0,72	-
α	1,25	1,23	1,16	1,12

C = 0,1 mg/mL; T = 25 °C; FM = metanol (100%); $V_{\text{injeção}} = 20 \mu\text{L}$; Q = 4,0 mL/min; $\lambda = 302 \text{ nm}$.

Pode-se observar um decréscimo na resolução e no fator de separação após um determinado tempo de uso da coluna cromatográfica. A diminuição da capacidade de discriminação quiral da fase estacionária pode ser atribuída, provavelmente, à perda de seletor quiral, o qual está apenas adsorvido fisicamente sobre as partículas de sílica.

Os perfis de eluição dos enantiômeros referentes a P1, P2, P3 e P4 são apresentados na Figura 4.45.

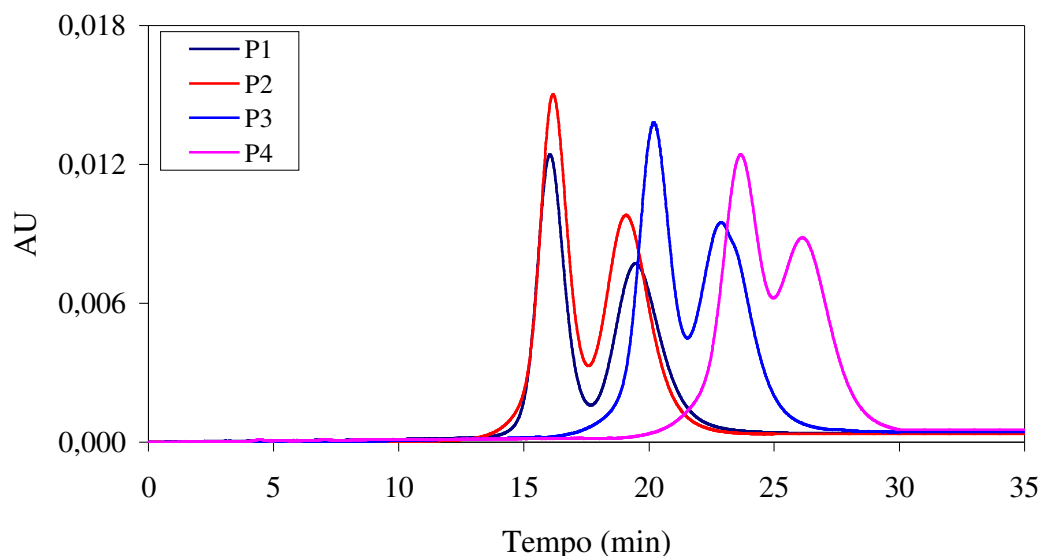


Figura 4.45: Perfis de eluição dos enantiômeros do omeprazol referentes a P1, P2, P3 e P4. Coluna SP5. Condições experimentais: C = 0,1 mg/mL; T = 25 °C; FM = metanol (100%); $V_{\text{injeção}} = 20 \mu\text{L}$; Q = 4,0 mL/min; $\lambda = 302 \text{ nm}$.

Pode-se observar um aumento no tempo de retenção provavelmente devido a interações não específicas entre os enantiômeros do omeprazol e o polissacarídeo não reagido e/ou a superfície da sílica não recoberta durante o processo de recobrimento.

CAPÍTULO 5

CONCLUSÕES E SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

No presente estudo, alcançou-se o objetivo inicialmente proposto referente à síntese da fase estacionária quiral tris(3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose visando avaliar o aumento de escala, a partir de uma metodologia definida em escala analítica, e a separação enantiomérica do fármaco omeprazol em escala preparativa.

5.1 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados mostrados no Capítulo 4, o derivado de polissacarídeo apresentou substituições quase completas dos grupos hidroxila e absorções na região do infravermelho próximas a 1720 cm^{-1} de forte intensidade, sendo estas, absorções características para a presença de de grupamentos carbonílicos (C=O). Foi possível também observar a presença de absorções em 1220 cm^{-1} , referente ao estiramento da ligação C-N e em 3294 cm^{-1} referente à deformação axial da ligação N-H. As bandas próximas a 1643 e 1562 cm^{-1} foram atribuídas, respectivamente, a carbonila do derivado de uréia e à deformação angular da ligação N-H. A espectroscopia corroborou o resultado da análise elementar pela ausência de absorção próxima a 3417 cm^{-1} referente aos grupos hidroxila inicialmente presentes no espectro da amilose.

A análise das partículas de sílica e da FEQ, por espalhamento de laser, forneceram um diâmetro médio de partícula igual 9 e 17 μm , respectivamente. A microscopia eletrônica de varredura mostrou o recobrimento da superfície das partículas da sílica pelo carbamato e a esfericidade e uniformidade das mesmas.

O teste t mostrou que para uma mesma coluna, nem todas as porosidades obtidas em diferentes vazões e temperaturas são estatisticamente equivalentes considerando um nível de significância de 95%. Tal dispersão pode ser atribuída a erros experimentais decorrentes do método de determinação da porosidade total. O mesmo comportamento foi observado entre as porosidades de cada coluna, ou seja, apenas algumas apresentaram valores equivalentes, em um nível de confiança de 95%. Neste caso, a variabilidade dos dados foi atribuída ao método de empacotamento uma vez que as condições experimentais utilizadas no processo foram as mesmas para as nove colunas.

Os resultados dos testes estatísticos baseados na análise da variância (teste F) mostraram que, com 95% de confiabilidade, as variâncias das porosidades obtidas em cada vazão e temperatura foram equivalentes, ou seja, os erros cometidos na determinação da porosidade, nas diferentes vazões e temperaturas estudadas, foram os mesmos. Os erros relacionados ao processo de empacotamento também apresentaram a mesma variabilidade, em um nível de significância de 95%, o que significa que os erros cometidos ao empacotar cada coluna são os mesmos durante todo o processo, embora as porosidades não sejam equivalentes.

A recuperação do enantiômero de interesse, S-(-)-omeprazol, é significativamente influenciada pela porosidade total. Variações da ordem de 1 e 3% nos valores implicam em uma recuperação de 51-100% e de 10-100%, respectivamente.

Os gráficos de van Deemter mostraram uma relação linear entre a altura equivalente a um prato e a velocidade superficial da fase móvel. A inexistência de um valor mínimo no gráfico demonstrou que os efeitos de difusão molecular podem ser desprezados e a eficiência da coluna é influenciada apenas pelos efeitos de dispersão axial e de transferência de massa. A diferença nos valores de k_m para cada enantiômero pode ser atribuída à diferente cinética do processo de adsorção-dessorção. Valores mais elevados foram apresentados pelo enantiômero S-(-).

Os valores da constante de Henry diminuíram com a elevação da temperatura devido a uma aproximação dos picos cromatográficos. O aumento da temperatura diminui a viscosidade da fase móvel e conseqüentemente os tempos de retenção dos enantiômeros e a sua interação com a FEQ. Valores mais elevados para o R-(+)-omeprazol indicam uma maior afinidade da fase estacionária por esse enantiômero do que pelo enantiômero S-(-).

O teste t, aplicado entre as variâncias das constantes de Henry de cada coluna, também mostrou que apenas algumas colunas possuem constantes de Henry estatisticamente equivalentes, considerando uma confiabilidade de 95%.

Os parâmetros cromatográficos, fator de separação e resolução, apresentaram valores entre 1,18 e 1,39 e 1,16 e 1,96, respectivamente. Observou-se um decréscimo nesses parâmetros após um determinado tempo de uso da coluna cromatográfica. A diminuição da capacidade de discriminação quiral da fase estacionária pode ser atribuída à perda de seletor quiral, o qual está apenas adsorvido fisicamente sobre as partículas de sílica. Também observou-se um aumento no tempo de retenção dos enantiômeros provavelmente devido a interações não específicas com o polissacarídeo não reagido e/ou a superfície da sílica não recoberta durante o processo de recobrimento.

Os valores negativos de ΔH^0 indicam que é energeticamente mais favorável o soluto estar na adsorvido na FEQ do que em solução. Além disso, o valor deste parâmetro foi maior para o enantiômero R-(+) devido a sua maior interação com a FEQ. Os valores negativos de ΔS^0 indicam que os enantiômeros do omeprazol encontram-se mais ordenados no estado adsorvido do que em solução.

No intervalo de concentração analisado, o modelo de isoterma de Langmuir foi bem correlacionado aos dados experimentais de equilíbrio. A capacidade de saturação da fase estacionária sintetizada neste trabalho é relativamente inferior à capacidade da mesma fase disponível comercialmente. A diferença está provavelmente relacionada à derivação dos grupos hidroxila da amilose e à obtenção de um derivado de uréia, durante a reação de síntese do carbamato, e ao processo de recobrimento.

5.1 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

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

- Avaliação das variáveis de operação durante a etapa de síntese do derivado de polissacarídeo, como controle de temperatura e utilização de um FT-IR em linha;

- Avaliação do método de recobrimento e de outras sílicas como suporte cromatográfico;
- Avaliação de outros métodos de empacotamento, como compressão axial e vácuo;
- Avaliação da variável de desempenho recuperação em um processo preparativo em batelada com sistema de reciclo;
- Estudo da separação dos enantiômeros do omeprazol em sistemas cromatográficos contínuos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABURATANI, R.; OKAMOTO, Y.; HATADA, K. Optical resolving ability of 3,5-dimethylphenylcarbamates of oligosaccharides and cyclodextrins. **The Chemical Society of Japan**. 63, p.3606-3610, 1990.

ANDERSSON, S.; JUZA, M. New process. WO 03/051867 A1, 18 dec. 2001, 26 jun. 2003.

ANDERSSON, S.; NELANDER, H.; ÖHLÉN, K. Preparative chiral chromatography and chiroptical characterization of enantiomers of omeprazole and related benzimidazoles. **Chirality**. 19, p. 706-715, 2007.

ARAÚJO, J. M. M.; RODRIGUES, R. C. R.; MOTA, J. P. B. Determination of competitive isotherms of enantiomers by a hybrid inverse method using overloaded band profiles and the periodic state of the simulated moving-bed process. **Journal of Chromatography A**. 1189, p. 302-313, 2008.

ARNELL, R.; FORSSÉN, P.; FORNSTEDT, T. Accurate and rapid estimation of adsorption isotherms in liquid chromatography using the inverse method on plateaus. **Journal of Chromatography A**. 1099, p. 167-174, 2005.

ARNOLD, F. H.; BLANCH, H. W.; WILKE, C.R. Analysis of affinity separations. II: The characterization of affinity columns y pulse techniques. **The Chemical Engineering Journal**. 30, p. B25-B-36, 1985a.

_____. Liquid chromatography plate height equations. **Journal of Chromatography**. 330, p. 159-166, 1985b.

BAIRD, C. P.; TAYLOR, P. C. Asymmetric synthesis of epoxides using chiral sulfimides. **Journal of Chemical Society; Chemical Communications**. p. 893-894, 1995.

BALMÉR, K.; PERSSON, B. A.; LAGERSTRÖM, P. O. Stereoselective effects in the separation of enantiomers of omeprazole and other substituted benzimidazoles on different chiral stationary phases. **Journal of Chromatography A**. 660, p. 269-273, 1994.

BARGMANN-LEYDER, N.; TAMBUTÉ, A.; CAUDE, M. A comparison of LC and SFC for cellulose- and amylose-derived charal stationary phases. **Chirality**. 7, p. 311-325, 1995.

BONATO, P. S. et al. Enantiomeric resolution of drugs and metabolites in polysaccharide- and protein-based chiral stationary phases. **Química Nova**. v. 13, n. 2, p. 190-199, 2002.

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

BOOTH, T. D.; WAINER, I. W. Mechanistic investigation into the enantioselective separation of mexiletine and related compounds, chromatographed on an amylose tris(3,5-dimethylphenylcaramate) chiral stationary phase. **Journal of Chromatography A**. 741, p. 205-211, 1996.

BRASIL. RESOLUÇÃO-RDC nº 135, 29 de maio de 2003. Disponível em <<http://www.anvisa.gov.br>>. Acesso em 5 set. 2003.

BRASIL. RESOLUÇÃO-RDC nº 136, 29 de maio de 2003. Disponível em <<http://www.anvisa.gov.br>>. Acesso em 5 set. 2003.

BRUNTON, L. L. Fármacos para controle da acidez gástrica e tratamento de úlceras pépticas. In: **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. 9. ed. Rio de Janeiro, RJ: McGraw-Hill Interamericana Editores, S.A. de C.V., 1996. cap. VI, p. 663-674.

BURGER, D. et al. Determination and comparison of competitive isotherms by frontal analysis and frontal velocity analysis. **Chromatographia**. v. 51, n. 9/10, p. 517-525, 2000.

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

CANCELLIERE, G. et al. Twenty years of research on silica based chiral stationary phases. **Journal of Separation Science**. 29, p. 770-781, 2006.

CASS, Q. B.; BASSI, A. L.; MATLIN, S. A. Chiral discrimination by HPLC on aryl carbamate derivatives of chitin coated onto microporous aminopropyl silica. **Chirality**. 8, p. 131-135, 1996.

_____. First direct resolution of gossypol enantiomers on a chiral high-performance liquid chromatography phase. **Chirality**. 11, p. 46-49, 1999.

CASS, Q. B.; DEGANI, A. L. G. Parâmetros cromatográficos. In: **Desenvolvimento de Métodos por HPLC: Fundamentos, Estratégias e Validação**. São Carlos: Editora da UFSCar, 2001. cap. 3, p. 11-16.

CASS, Q. B.; DEGANI, A. L. G.; CASSIANO, N. The use of a polysaccharide-based column on multimodal elution. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**. v. 23, n. 7, p. 1029-1038, 2000.

CASS, Q. B. et al. Gossypol enantiomer ratios in cotton seeds. **Phytochemistry**. v. 30, n. 8, p. 2655-2657, 1991.

CASS, Q. B. et al. Enantiomeric resolution by HPLC of chiral amides using amylose tris[(S)-1-phenylethylcarbamato. **Chirality**. 9, p. 109-112, 1997a.

CASS, Q. B. et al. Discriminação quiral por CLAE em carbamatos de polissacarídeos: desenvolvimento, aplicações e perspectivas. **Química Nova**. v. 20, n. 1, p. 49-57, 1997b.

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

CAVAZZINI, A. et al. Study of the adsorption equilibria of the enantiomers of 1-phenyl-1-propanol on cellulose tribenzoate using a microbore column. **Journal of Chromatography A**. 953, p. 55-66, 2002.

CAVAZZINI, A.; FELINGER, A.; GUIOCHON, G. Comparison between adsorption isotherm determination techniques and overloaded band profiles on four batches of monolithic columns. **Journal of Chromatography A**. 1012, p. 139-149, 2003.

CHANKVETADZE, B. et al. Comparative enantioseparation of selected chiral drugs on four different polysaccharide-type chiral stationary phases using polar organic mobile phases. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. 27, p. 467-478, 2002.

CHANKVETADZE, B.; YASHIMA, E.; OKAMOTO, Y. Tris(chloro- and methyl-disubstituted phenylcarbamate)s of cellulose as chiral stationary phases for chromatographic enantioseparation. **Chemistry Letters**. p. 617-620, 1993.

_____. Chloromethylphenylcarbamate derivatives of cellulose as chiral stationary phases for high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**. 670, p. 39-49, 1994.

_____. Dimethyl-, dichloro- and chloromethylphenylcarbamates of amylose as chiral stationary phases for high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**. 694, p. 101-109, 1995.

CHERRAK, D. E.; KHATTABI, S.; GUIOCHON, G. Adsorption behavior and prediction of the band profiles of the enantiomers of 3-chloro-1-phenyl-1-propanol. Influence of the mass transfer kinetics. **Journal of Chromatography A**. 877, p. 109-122, 2000.

CIRILLI, R. et al. Analytical and semipreparative high performance liquid chromatography enantioseparation of new substituted 1-thiocarbamoyl-3,5-diaryl-4,5-dihydro-(1*H*)-pyrazoles on polysaccharide-based chiral stationary phases in normal-phase, polar organic and reversed-phase conditions. **Journal of Chromatography A**. 1101, p. 198-203, 2006.

COIMBRA, M. **Determinação do coeficiente cromatográfico de partição, $\log k_w$, dos inibidores da bomba H^+/K^+ -ATPase**. 2007. X f. Dissertação (Mestrado em Química Orgânica)-Departamento de Química do Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia da Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2007.

COLE, L. A.; DORSEY, J. G. Temperature dependence of retention in reversed-phase liquid chromatography. 1. Stationary-phase considerations. **American Chemical Society**. 64, p. 1317-1323, 1992.

COLLINS, C. H. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. In: **Fundamentos de Cromatografia**. Campinas: Editora da UNICAMP, 2006. cap. I, p. 17-45.

DEGANI, A. L. G. **Desenvolvimento e aplicação de cromatografia líquida de alta eficiência multimodal e multidimensional com colunas de polissacarídeos em estudos de barreiras de racemização e determinação dos enantiômeros do pantoprazol em plasma**. 2001. 108 f. Tese (Doutorado em Química Orgânica)-Departamento de Química do Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia da Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2001.

DEL NOZAL, M. J. et al. Chiral separation of omeprazole and several related benzimidazoles using supercritical fluid chromatography. **Journal of Separation Science**. 27, p. 1023-1029, 2004.

DUAN, G.; CHING, A. 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**. 69, p. 111-117, 1998.

ERLANDSSON P. et al. Resolution of the enantiomers of omeprazole and some of this analogues by liquid chromatography on a trisphenylcarbamoylcellulose-based stationary phase. **Journal of Chromatography**. 532, p. 305-319, 1990.

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

FELINGER, A.; GRITTI, F.; GUIOCHON, G. Repeatability and reproducibility of high-concentration data in reversed-phase liquid chromatography, III Isotherm reproducibility on Kromasil C₁₈. **Journal of Chromatography A**. 1024, p. 21-38, 2004.

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

FELIX, G. Regioselectively modified polysaccharide derivatives as chiral stationary phases in high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**. 906, p. 171-184, 2001.

FORNSTEDT, T. et al. Dependence on the mobile-phase pH of the adsorption behavior of propranolol enantiomers on a cellulose protein used as the chiral selector. **Journal of American Chemical Society**. 121, p. 1164-1174, 1999.

FRANCO, P. et al. Covalently bonded polysaccharide derivatives as chiral stationary phases in high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**. 906, p. 155-170, 2001.

FRANCO, P. et al. 3,5-Dimethylphenylcarbamates of amylose, chitosan and cellulose bonded on silica gel - Comparison of their chiral recognition abilities as high-performance

liquid chromatography chiral stationary phases. **Journal of Chromatography A**. 796, p. 265-272, 1998.

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

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

_____. Chiral stationary phases for preparative enantioselective chromatography. In: **Preparative Enantioselective Chromatography**. 1st ed. Oxford: Blackwell Publishing, 2005. chap. 3, p. 48-77.

FRANCOTTE, E.; BUCHHEIT, A.J. Preparative chromatography separation of enantiomers. **Journal of Chromatography A**. 576, p. 1-45, 1992.

GASPARRINI, F.; MISITI, D.; VILLANI, C. High-performance liquid chromatography chiral stationary phases based on low-molecular-mass selectors. **Journal of Chromatography A**. 906, p. 35-50, 2001.

GOOSSENS, J. et al. 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, n. 5/6, p. 305-313, 2004.

GRAFF, G. Custom chemicals makers stress chiral technologies. **Plant Engineering Magazine**. jul. 2002. Disponível em <<http://www.technology-catalysts.com/pdf/TCI-PlantEngineering-0702.pdf>>. Acesso em 5 set. 2006.

GRIEB, S. J. et al. Chiral high-performance chromatography with cellulose carbamate-coated phases. Influence of support surface chemistry on enantioselectivity. **Journal of Chromatography A**. 697, p. 271-278, 1995.

GRILL, C. M.; MILLER, L.; YAN, T. Q. Resolution of a racemic pharmaceutical intermediate: A comparison of preparative HPLC, steady state recycling and simulated moving bed. **Journal of Chromatography A**. 1026, p. 101-108, 2004.

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

_____. Critical contribution of nonlinear chromatography to the understanding of retention mechanism in reversed-phase liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**. 1099, p. 1-42, 2005.

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

_____. The limits of the separation power of unidimensional column liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, 1126, p. 6-49, 2006.

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

GUIOCHON, G.; LIN, B. **Modeling for Preparative Chromatography**. Amsterdam: Academic Press, 2003. 342 p.

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

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

JAMES, E. A. et al. Determination of binary competitive equilibrium isotherms from the individual chromatographic band profiles. **Chemical Engineering Science**. 54, p. 1677-1696, 1999.

JARDIM, I. C. S. F.; COLLINS, C. H.; GUIMARÃES, L. F. L. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. In: **Fundamentos de Cromatografia**. Editora da UNICAMP: Campinas, 2006. cap. IX, p. 273-398.

KACZMARSKI, K. Estimation of adsorption isotherm parameters with inverse method - possible problems. **Journal of Chromatography A**. 1176, p. 57-68, 2007.

KAHRILAS, P. J. et al. Esomeprazole improves healing and symptom resolution as compared with omeprazole in reflux oesophagitis patients: a randomized controlled trial. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**. 14, p. 1249-1258, 2000.

KAIDA, Y; OKAMOTO, Y. Efficient optical resolution of 4-hydroxy-2-cyclopentenone derivatives by HPLC on 1-phenylethylcarbamates of cellulose and amylose. **Chemistry Letters**. p. 85-88, 1992.

KANAZAWA, H. Stereospecific analysis of omeprazole in human plasma as a probe for CYP2C19 phenotype. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. 30, p. 1817-1824, 2003.

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

KRIJGSMAN, J. Purification. In: **Product Recovery in Bioprocess Technology**. 1st ed. Oxford: Butterworth-Heinemann, England, 1992. chap. 7, p. 163-207.

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

LIND, T. et al. Esomeprazole provides improved acid control vs. omeprazole in patients with symptoms of gastro-oesophageal reflux disease. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**. 14, p. 861-867, 2000.

LINDBERG, P. L.; VON UNGE, S. USP 6875872, 05 de abril de 2005. Disponível em <<http://www.drugpatentwatch.com>>. Acesso em 13 mai. 2009.

LOPES, W.A.; FASCIO, M. Esquema para interpretação de espectros de substâncias orgânicas na região do infravermelho. **Química Nova**, v. 27, n. 4, p. 670-673, 2004.

MATLIN, S. A.; TIRITAN, M. E.; CRAWFORD, A. J.; CASS, Q. B.; BOYD, D. R. High with carbohydrate carbamate chiral phases: Influence of chiral phase structure on enantioselectivity. **Chirality**. v. 6, n. 2, p. 135-140, 1994.

MIHLBACHLER, K. et al. Effect of the homogeneity of the column set on the performance of a simulated moving bed unit. I. Theory. **Journal of Chromatography A**. 908, p. 49-70, 2001.

MIHLBACHLER, K. et al. Effect of the homogeneity of the column set on the performance of a simulated moving bed unit. II. Experimental study. **Journal of Chromatography A**. 944, p. 3-22, 2002a.

MIHLBACHLER, K. et al. Measurement and modeling of the equilibrium behavior of the Tröger's base enantiomers on an amylose-based chiral stationary phase. **Journal of Chromatography A**. 955, p. 35-52, 2002b.

MIHLBACHLER, K. et al. Adsorption behavior of the (\pm)-Troger's base enantiomers in the phase system of a silica-based packing coated with amylose tri(3,5-dimethyl carbamate) and 2-propanol and molecular modeling interpretation. **Journal of Chromatography A**. 1113, p. 148-161, 2006.

MIHLBACHLER, K.; SEIDEL-MORGENSTERN, A.; GUIOCHON, G. Detailed study of Tröger's base separation by SMB process. **American Institute of Chemical Engineers**. v. 50, n. 3, p. 611-624, 2004.

MIYABE, K.; GUIOCHON, G. Kinetic study of the mass transfer of S-Tröger's base in the system cellulose triacetate and ethanol. **Journal of Chromatography A**. 849, p. 445-465, 1999.

_____. A kinetic study of mass transfer in reversed-phase liquid chromatography on a C18-silica gel. **Analytical Chemistry**. 72, p. 5162-5171, 2000.

NELSON, D. L.; COX, M. M. Carbohydrates and Glycobiology. In: **Principles of Biochemistry**. 4th ed. New York: W. H. Freeman and Company, 2005. chap. 7, p. 238-272.

NICOUD, R. M.; FUCHS, G.; ADAM, P.; BAILLY, M.; KÜSTERS, E.; ANTIA, F. D.; REUILLE, R.; SCHMID, E. Preparative scale enantioseparation of a chiral epoxide: Comparison of liquid chromatography and simulated moving bed adsorption technology. **Chirality**. v. 5, n. 4, p. 267-271, 1993.

NOËL, F. et al. Estudos de bioequivalência para fármacos que apresentam estereoisomerismo. **Infarma**. v. 16, n. 11-12, p. 64-67, 2004.

OGUNI, K.; ODA, H.; ICHIDA, A. Development of chiral stationary phases consisting of polysaccharide derivatives. **Journal of Chromatography A**. 694, p. 91-100, 1995.

OKAMOTO, Y. et al. Chiral stationary phases for HPLC: cellulose tris(3,5-dimethylphenylcarbamate) and tris(3,5-dichlorophenylcarbamate) chemically bonded to silica gel. **Journal of Liquid Chromatography**. v. 10, n. 8 & 9, p. 1613-1628, 1987.

OKAMOTO, Y. et al. Tris(1-phenylethylcarbamate)s of cellulose and amylase as useful chiral stationary phases for chromatographic optical resolution. **Chemistry Letters**. p. 909-912, 1990.

OKAMOTO, Y.; KAIDA, Y. Polysaccharide derivatives as chiral stationary phases in HPLC. **Journal of Resolution Chromatography**. v. 13, october, p. 708-712, 1990.

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

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

_____. Controlled chiral recognition of cellulose triphenylcarbamate derivatives supported on silica gel. **Journal of Chromatography**. 363, p. 173-186, 1986.

OLIVEROS, L. et al. Carbamates of cellulose bonded on silica gel: chiral discrimination ability as HPLC chiral stationary phases. **Chirality**. 10, p. 283-288, 1998.

OLIVEROS, L. et al. Chiral chromatographic discrimination ability of a cellulose 3,5-dimethylphenylcarbamate/10-undecenoate mixed derivative fixed on several chromatographic matrices. **Journal of Liquid Chromatography**. v. 18, n. 8, p. 1521-1532, 1995.

OLIVEROS, L.; SENSO, A.; MINGUILLÓN, C. Benzoates of cellulose bonded on silica gel: chiral discrimination ability as high-performance liquid chromatographic chiral stationary phases. **Chirality**. 9, p. 145-149, 1997.

ORLANDO R. M.; BONATO, P. S. Simple and efficient method for enantioselective determination of omeprazole in human plasma. **Journal of Chromatography B**. 795, p. 227-235, 2003.

PEDEFERRI, M. P. et al. Experimental analysis of a chiral separation through simulated moving bed chromatography. **Chemical Engineering Science**, 54, p. 3735-3748, 1999.

PÉTER, A. et al. Effect of temperature on retention of enantiomers of β -methyl amino acids on a teicoplanin chiral stationary phase. **Journal of Chromatography A**. 828, p. 177-190, 1998.

PÉTER, A.; VÉKES, E.; ARMSTRONG, D. W. Effects of temperature on retention of chiral compounds on a ristocetin A chiral stationary phase. **Journal of Chromatography A**. 958, p. 89-107, 2002.

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**. 1003, p. 73-89, 2003.

PINHEIRO, S.; FERREIRA, V. F. Abordagens em síntese assimétrica. **Química Nova**. v. 21, n. 3, p. 312-318, 1998.

PIRKLE, W. H.; POCHAPSKY, T. C. Considerations of chiral recognition relevant to the liquid chromatographic separation of enantiomers. **Chemical Reviews**. v. 89, n. 2, p. 347-362, 1989.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M. Drogas que afetam os principais sistemas orgânicos. In: **Farmacologia**. 4. ed. Rio de Janeiro, RJ: Guanabara Koogan, 2001. cap. 3, p. 305-317.

REKOSKE, J. E. Chiral Separations. **AIChE Journal**. v. 47. n.1, p. 2-5, 2001.

RIBEIRO A. E. et al. Preparative separation of ketoprofen enantiomers: choice of mobile phase composition and measurement of competitive adsorption isotherms **Separation and Purification Technology**. 61, p. 375-383, 2008.

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 derivatives on a teicoplanin aglycone chiral stationary phase. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**. vol. 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 (0,0'-bis[4-*terc*-butilbenzoil]-*n,n'*-dialil-*l*-tartardiamida)**. 2005. 117 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química)-Faculdade de Engenharia Química da Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2005.

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

SAJONZ, P. Influence of the column hold-up time measurement accuracy on the prediction of chromatographic band profiles. **Journal of Chromatography A**, v. 1050, p. 129-135, 2004.

SAMUELSSON, J.; SAJONZ, P.; FORNSTEDT, T. Impact of an error in the hold-up time for correct adsorption isotherm determination in chromatography. I Even a small error can lead to a misunderstanding of the retention mechanism. **Journal of Chromatography A**, v. 1189, p. 19-31, 2008.

SAMUELSSON, J. et al. Impact of an error in the column hold-up time for correct adsorption isotherm determination in chromatography. II Can a wrong column porosity lead to a correct prediction of overloaded elution profiles? **Journal of Chromatography A**, v. 1194, p. 205-212, 2008.

SARTOR, J. P. **Separação cromatográfica do fármaco rolipram utilizando fase estacionária *O,O'*-bis[*terc*-butilbenzoil]*N,N'*-dialil-*L*-tartardiamida**. 2006. 113 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química)-Faculdade de Engenharia Química da Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.

SCHMIDT-TRAUB, H. **Preparative Chromatography**. 1st ed. Weinheim: Wiley-VCH, 2005. 458 p.

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

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

SEVERO JR., J. B. **Síntese biocatalítica do sorbitol e ácido lactobiônico com separação simultânea por eletrodialise**. 2008. 133 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química)-Universidade Federal do Rio de Janeiro, COPPE, Rio de Janeiro, 2008.

SEWELL, P. A.; CLARKE, B. The quality of chromatographic separations. In: **Chromatographic Separations**. London: John Wiley & Sons, 1987. chap. 3, p. 74-146.

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

SOLOMONS, T. W. G.; FRYHLE, C. B. Stereochemistry: Chiral molecules. In: **Organic Chemistry**. 7th ed. New York: John Wiley & Sons, 2000. chap. 5, p. 184-210.

STALCUP, A. M.; WILLIAMS, K. L. Comparison of 1-(1-naphthyl)ethylcarbamate derivatives of a carbohydrate bonded chiral stationary phase. **Journal of Chromatography A**. 695, p. 185-193, 1995.

STENHOFF, H.; BLOMQVIST, Å.; LAGERSTRÖM, P. O. Determination of the enantiomers of omeprazole in blood plasma by normal-phase liquid chromatography and detection by atmospheric pressure ionization tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**. 734, p. 191-201, 1999.

STRYER, L. Carbohydrates. In: **Biochemistry**. 3th ed. New York: W. H. Freeman and Company, 1988. chap. 14, p. 313-544.

SUN, S. et al. Determination and comparison of competitive isotherms by rectangular pulse method and frontal velocity analysis method. **Journal of Chromatography A**. 918, p. 13-23, 2001.

SVEC, F.; WULFF, D.; FRÉCHET, M. J. Combinatorial Approaches to Recognition of Chirality: Preparation and Use of Materials for the Separation of Enantiomers. In: **Chiral Separation Techniques: A Practical Approach**. 2nd ed. Weinheim: Wiley-VCH, 2001. chap. 3, p. 57-96.

THERAPEUTIC PRODUCTS PROGRAMME. Stereochemical issues in chiral drug development. February 14, 2000. Disponível em <http://www.hc-sc.gc.ca/dhp-mps/alt_formats/hpfb-dgpsa/pdf/prodpharma/stereo_e.pdf>. Acesso em: 9 out. 2006.

THUNBERG, L.; HASHEMI, J.; ANDERSSON, S. comparative study of coated and immobilized polysaccharide-based chiral stationary phases and their applicability in the resolution of enantiomers. **Journal of Chromatography B**. 875, p. 72-80, 2008.

TIRITAN, M. E. Resolução enantiomérica de sulfóxidos quirais por CLAE, em carbamatos de polissacarídeos. 1996. 136 f. Tese (Doutorado em Química Orgânica)-Departamento de Química do Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia da Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 1996.

TORIBIO, L. et al. Enantiomeric separation of chiral sulfoxides by supercritical fluid chromatography. **Journal of Separation Science**. 29, p. 1363-1372, 2006.

TUCKER, G. T. Chiral switches. **The Lancet**. 355, p. 1085-1087, 2000.

UNITED STATES FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Center for Drug Evaluation and Research. FDA's Policy statement for the development of new stereoisomeric drugs. May 1, 1992. Disponível em: <<http://www.fda.gov/cder/guidance/stereo.htm>>. Acesso em: 9 out. 2006.

VEREDAS, V. **Cromatografia contínua em leito móvel simulado para a purificação dos enantiômeros do n-boc-baclofeno-lactama**. 2005. 110 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química)-Faculdade de Engenharia Química da Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2005.

VERSTEEG, M. et al. The first enantioselective synthesis of isoflavonoids: (R)- and (S)-Isoflavans. **Journal of Chemical Society; Chemical Communications**. p. 1317-1318, 1995.

WAINER, I. W. et al. Using chirality as a unique probe of pharmacological properties. **Journal of Chromatography A**. 694, p. 169-179, 1995.

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 and Technology**. v. 37, n. 11, p. 2567-2586, 2002.

WANG, F. et al. Unusual effect of column temperature on chromatographic enantioseparation of dihydropyrimidone acid and methyl ester on amylose chiral stationary phase. **Journal of Chromatography A**. 958, p. 69-77, 2002.

WEI, F.; SHEN, B.; CHEN, M. From analytical chromatography to simulated moving bed chromatography: resolution of omeprazole enantiomers. **Industrial & Engineering Chemistry Research**. 45, p. 1420-1425, 2006.

WENG, W. et al. Influence of mobile phase composition on the apparent thermodynamic characteristics in liquid chromatographic enantioseparation on a tartardiamide-based stationary phase. **Chromatographia**, v. 61, n. 11/12, p. 561-566, 2005.

YASHIMA, E. Polysaccharide-based chiral stationary phases for high-performance liquid chromatographic enantioseparation. **Journal of Chromatography A**. 906, p. 105-125, 2001.

YASHIMA, E.; FUKAYA, H.; OKAMOTO, Y. 3,5-Dimethylphenylcarbamates of cellulose and amylose regioselectively bonded to silica gel as chiral stationary phases for high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**. 677, p. 11-19, 1994.

YASHIMA, E.; OKAMOTO, Y. Chiral discrimination on polysaccharides derivatives. **Bulletin of the Chemical Society of Japan**. 68, p. 3289-3307, 1995.

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

ZDZISLAW, C. et al. Enantioselective separation of 1,4-disubstituted piperazine derivatives on two cellulose Chiracel OD and OJ and one amylose Chiralpack AD chiral selectors. **Chirality**. v. 11, p. 790-794, 1999.

ZHANG, T.; FRANCO, P. Analytical and preparative potential of immobilized polysaccharide-derived chiral stationary phases. In: **Chiral Separation Techniques**. 3th ed. Weinheim: Wiley-VCH, 2007. chap. 3, p. 99-134.

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

ZHOU, D. et al. Prediction of the band profiles of the mixtures of the 1-indanol enantiomers from data acquired with the single racemic mixture. **Chemical Engineering Science**. 58, p. 3257-3272, 2003.

ZHOU, D.; KACZMARSKI, K.; GUIOCHON, G. Comparison of the binary equilibrium isotherms of the 1-indanol enantiomers on three high-performance liquid chromatography columns of different sizes. **Journal of Chromatography A**. 1015, p. 73-87, 2003.

ZUYI, T.; CHANGYIN, Y.; QING, H. Determination of adsorption equilibrium constant and HETP of amino acids on dextran-type ion-exchangers columns-a study on isocratic elution chromatography and moment method. **Reactive & Functional Polymers**. 28, p. 221-226, 1996.