



SEPARAÇÃO CROMATOGRÁFICA DOS ENANTIÔMEROS DE
O,P'-DICLORODIFENILDICLOROETANO SOB CONDIÇÕES LÍQUIDAS E
SUPERCRÍTICAS

Francine Silva Antelo

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Química, COPPE, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários á obtenção do título de Doutor em Engenharia Química

Orientadores: Tito Lívio Moitinho Alves
Amaro Gomes Barreto Júnior
Cesar Costapinto Santana

Rio de Janeiro

Maio de 2011

SEPARAÇÃO CROMATOGRÁFICA DOS ENANTIÔMEROS DE
O,P'-DICLORODIFENILDICLOROETANO SOB CONDIÇÕES LÍQUIDAS E
SUPERCRÍTICAS

Francine Silva Antelo

TESE SUBMETIDA AO CORPO DOCENTE DO INSTITUTO ALBERTO LUIZ COIMBRA
DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA DE ENGENHARIA (COPPE) DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DO RIO DE JANEIRO COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS
PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR EM CIÊNCIAS EM ENGENHARIA
QUÍMICA.

Examinada por:



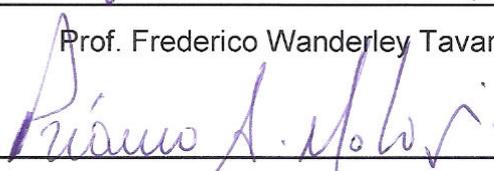
Prof. Tito Lívio Moitinho Alves, D.Sc.



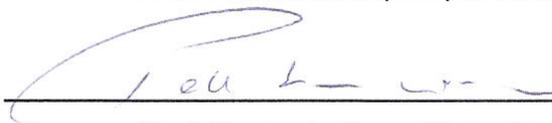
Prof. Cesar Costapinto Santana, D.Sc.



Prof. Frederico Wanderley Tavares, D.Sc.



Prof. Príamo Albuquerque Melo Jr., D.Sc.



Prof. Paulo de Tarso Vieira Rosa, D.Sc.

RIO DE JANEIRO, RJ - BRASIL

MAIO DE 2011

..

Antelo, Francine Silva

Separação cromatográfica dos enantiômeros do o,p'-diclorodifenildicloroetano sob condições líquidas e supercríticas/Francine Silva Antelo. - Rio de Janeiro: UFRJ/COPPE, 2011.

XVI, 129p.: il.; 29,7 cm.

Orientadores: Tito Lívio Moitinho Alves, Amaro Gomes Barreto Jr., Cesar Costapinto Santana

Tese (doutorado) – UFRJ/ COPPE/ Programa de Engenharia Química, 2011.

Referências Bibliográficas: p. 109-129.

1. Cromatografia. 2. Enantioseparação. 3. Supercrítico. I. Alves, Tito Lívio Moitinho *et al.* II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, COPPE, Programa de Engenharia Química. III. Título.

“Comece fazendo o que é necessário, depois o que é possível,
e de repente você estará fazendo o impossível.”

São Francisco de Assis

Agradecimentos

À minha avó Lídia - sua dedicação eterna propiciou mais essa conquista, sua confiança, apoio e afeto foram essenciais que mais essa etapa se realizasse. Obrigada por tudo, sempre!

Aos professores Amaro, Cesar e Tito, pela orientação recebida e principalmente pela confiança depositada em mim ao longo desse trabalho. Obrigada pelo apoio, disponibilidade, paciência, incentivo e por me ouvirem nos momentos mais críticos em que o desânimo surgia!

Ao professor Andreas, pela oportunidade de ser sua orientada durante a realização do doutorado sanduiche junto ao seu grupo e pela hospitalidade enquanto estive na Alemanha. Obrigada pela oportunidade profissional e pessoal!

Ao professor Paulo do IQ/UNICAMP, pela sua disponibilidade, apoio e paciência. Sua ajuda foi essencial para a realização desse trabalho!

À amiga Ana Paula Manera pela constante disponibilidade em ajudar, generosidade, carinho e amizade. Feliz de quem tem a sorte de encontrar alguém como você!

Às secretárias do PEQ Paula dos Santos Barbosa e Luciana Lancellote Antunes, pelo auxílio incondicional, sobretudo ao longo dos muitos meses em que estive longe da UFRJ. Obrigada por tudo meninas!

Aos colegas do Laboratório de Bioseparação do PEQ/UFRJ, do Laboratório de Propriedades Reológicas e Coloidais da FEQ/UNICAMP e do PCG do Max-Planck Institute/Magdeburg, todos foram muito importantes ao longo dessa jornada!

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq pelo suporte financeiro.

Resumo da Tese apresentada à COPPE/UFRJ como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Doutor em Ciências (D.Sc.)

SEPARAÇÃO CROMATOGRÁFICA DOS ENANTIÔMEROS DE
O,P'-DICLORODIFENILDICLOROETANO SOB CONDIÇÕES LÍQUIDAS E
SUPERCRÍTICAS

Francine Silva Antelo

Maio/2011

Orientadores: Tito Lívio Moitinho Alves
Amaro Gomes Barreto Jr.
Cesar Costapinto Santana

Programa: Engenharia Química

No presente trabalho estudou-se a enantioseparação do mitotano utilizando-se CO_2 próximo ao ponto crítico como fase móvel adicionado de metanol, etanol ou isopropanol em quatro percentuais à 35°C e 80 e 160 bar. Em condições diluídas, a seletividade mais promissora foi obtida com 14% de metanol à 160 bar e à pressão constante, se mostrou uma forte função do potencial químico do mitotano adsorvido. Quando utilizado etanol e metanol, a retenção foi mais influenciada pelas características da fase sólida. Uma correlação semi-empírica descreveu o efeito da densidade da fase móvel e da concentração de modificador na constante de Henry e assim na seletividade e a análise termodinâmica mostrou que a enantioseparação foi conduzida entalpicamente. A análise dos experimentos com sobrecarga evidenciou a ausência de efeitos competitivos para o enantiômero menos retido e que o enantiômero mais retido contribui de forma diferente na quantidade adsorvida. O ponto ótimo para o processo em batelada foi alcançado para injeções de cerca de 0,2 mg, recuperando-se em torno de 80% do produto desejado com até 85% de pureza. Finalmente, experimentos de enantioseparação em LMS utilizando 60% de isopropanol/40% de metanol como fase móvel à 25°C foram realizados e uma comparação com os processos em batelada evidenciou a superioridade do processo contínuo.

Abstract of Thesis presented to COPPE/UFRJ as a partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor of Science (D.Sc.)

CHROMATOGRAPHIC SEPARATION OF ENANTIOMERS OF
O,P'-DICHLORODIPHENYLDICHLOROETHANE IN LIQUID AND SUPERCRITICAL
CONDITIONS

Francine Silva Antelo

May/2011

Advisors: Tito Lívio Moitinho Alves
Amaro Gomes Barreto Jr.
Cesar Costapinto Santana

Department: Chemical Engineering

In this work we studied the enantioseparation of mitotane using CO₂ near critical point as the mobile phase with addition of methanol, ethanol or isopropanol in four percentages at 35°C and 80 and 160 bar. In dilute conditions, the most promising selectivity was obtained with 14% methanol at 160 bar and at constant pressure, showed a strong function of chemical potential of adsorbed mitotane. When using ethanol and methanol, the retention was more influenced by the characteristics of the solid phase. A semi-empirical correlation described the effect of the density of mobile phase and concentration of modifier in the Henry's constant and thus the selectivity and thermodynamic analysis showed that the enantioseparation was conducted enthalpy. Analysis of the overload experiments showed the absence of competitive effects for the less retained enantiomer and the most retained enantiomer contribute differently in the adsorbed amount. The optimal point for the batch process has been achieved for injections of about 0.2 mg, recovering about 80% of the desired product with 85% purity. Finally, experiments using LMS with 60% of isopropanol/40% methanol as mobile phase at 25°C were performed and a comparison with batch processes showed the superiority of the continuous process.

Índice

Resumo	vi
Abstract	vii
Lista de Figuras	x
Lista de Tabelas	xii
Capítulo 1	
Introdução	1
1.1. Considerações gerais	1
1.2. Motivação	4
1.3. Objetivos	5
Capítulo 2	
Revisão Bibliográfica	7
2.1. Mitotano	7
2.2. Sistema cromatográfico linear	11
2.2.1. Método dos momentos e altura equivalente a um prato teórico	12
2.3. Cromatografia quiral	17
2.3.1. Cromatografia quiral com fluido nas proximidades do ponto crítico	20
2.4. Análise termodinâmica na adsorção	22
2.4.1. Condições diluídas	22
2.4.2. Influência da pressão e composição do modificador no equilíbrio	24
2.4.3. Condições de sobrecarga	28
2.5. Modos operacionais	32
2.5.1. Cromatografia preparativa em batelada	32
2.5.2. Leito móvel simulado	34
2.5.3. Otimização das condições operacionais	44
2.6. Planejamento de experimentos e estimação de parâmetros	46
2.7. O estado da arte da cromatografia com fluido nas proximidades do ponto crítico	49
Capítulo 3	
Materiais e Métodos	52
3.1. Materiais	52
3.1.1. Mitotano	52
3.1.2. Fase estacionária quiral	52
3.1.3. Fase móvel e solventes modificadores	53
3.1.4. Unidade de separação cromatográfica em leito fixo	53
3.1.5. Unidade de separação cromatográfica em leito móvel simulado	55
3.2. Métodos	56
3.2.1. Validação da unidade operacional com fluido nas proximidades do ponto crítico	56
3.2.1.1. Determinação da porosidade da coluna	56
3.2.1.2. Determinação do volume morto da unidade cromatográfica	57
3.2.1.3. Calibração do sistema de análise	57
3.2.2. Experimentos com soluções diluídas	58
3.2.2.1. Determinação da densidade	58
3.2.2.2. Avaliação da influência da pressão e da composição da fase móvel no equilíbrio de adsorção	59
3.2.2.3. Avaliação das constantes de Henry	60

3.2.2.4. Avaliação dos coeficientes de dispersão axial e de transferência de massa	61
3.2.2.5. Avaliação da influência da temperatura no equilíbrio de adsorção	61
3.2.3. Experimentos com soluções concentradas	61
3.2.3.1. Avaliação do equilíbrio de adsorção	61
3.2.4. Determinação das condições de operação	64
3.2.4.1. Processo em batelada	64
3.2.4.2. Processo em leito móvel simulado	64
3.2.4.2.1. Definição das fases estacionária e móvel	64
3.2.4.2.2. Solubilidade da amostra	65
3.2.4.2.3. Porosidades das colunas	65
3.2.4.2.4. Estimativa dos parâmetros de adsorção	65
3.2.4.2.5. Definição da região e pontos de operação	65
3.2.4.2.6. Avaliação das variáveis de desempenho	66
Capítulo 4	
Resultados e Discussões	67
4.1. Validação da unidade operacional com fluido nas proximidades do ponto crítico	67
4.1.1. Determinação da porosidade da coluna	67
4.1.2. Determinação do volume morto da unidade cromatográfica com fluido nas proximidades do ponto crítico	67
4.1.3. Calibração do sistema de análise	67
4.2. Experimentos com soluções diluídas	68
4.2.1. Avaliação da influência da pressão e da composição da fase móvel no equilíbrio de adsorção	68
4.2.2. Avaliação das constantes de Henry	77
4.2.3. Avaliação dos coeficientes de dispersão axial e de transferência de massa	80
4.2.4. Avaliação da influência da temperatura no equilíbrio de adsorção	83
4.3. Experimentos com soluções concentradas	88
4.3.1. Avaliação do equilíbrio de adsorção	88
4.4. Determinação das condições de operação	91
4.4.1. Processo em batelada	91
4.4.2. Processo em LMS	100
4.4.2.1. Definição das fases estacionária e móvel	100
4.4.2.2. Solubilidade da amostra	101
4.4.2.3. Porosidades e constantes de Henry	101
4.4.2.4. Definição da região e pontos de operação	102
4.4.2.5. Avaliação das variáveis de desempenho	103
Conclusões e Sugestões futuras	106
Referências Bibliográficas	109

Lista de Figuras

Figura 2.1.	Estrutura química do mitotano (o,p' DDD), cujo carbono quiral está identificado com ★.	10
Figura 2.2.	Relação entre HETP e a velocidade intersticial da fase móvel (u_0).	15
Figura 2.3.	Princípio básico do LMV.	36
Figura 2.4.	Regiões do plano (m_2, m_3) com diferentes regimes de separação em termos da pureza das correntes de saída, para um sistema descrito pela isoterma linear.	43
Figura 3.1.	Fluxograma da unidade experimental de cromatografia com fluido nas proximidades do ponto crítico do Laboratório de Bioseparação da Faculdade de Engenharia Química da UNICAMP.	54
Figura 3.2.	Unidade Knauer CSEP C912.	55
Figura 3.3.	Representação esquemática da unidade Knauer CSEP C912. Fonte: Adaptado de GROSFILS, 2009.	56
Figura 4.1.	Efeito das características da fase móvel (FM) no fator de retenção do mitotano quando utilizados percentuais de metanol (a), etanol (b) e isopropanol (c) a 160 bar.	73
Figura 4.2.	Efeito das características da fase sólida (FS) no fator de retenção do mitotano quando utilizados percentuais de metanol (a), etanol (b) e isopropanol (c) a 160 bar.	74
Figura 4.3.	Perfis do fator de retenção em função do percentual adicionado de metanol (a), etanol (b) e isopropanol (c) a 160 bar.	75
Figura 4.4.	Gráfico de van Deemter para o S (a) e o R-mitotano (b).	81
Figura 4.5.	Gráfico semi-logarítmico do fator de separação em função da temperatura. Conc = 1 mg/mL, T = 30, 35 e 40°C, FM = CO ₂ + 14% metanol, P = 160 bar, V _{inj} = 50 µL.	85
Figura 4.6.	Gráfico semi-logarítmico do fator de retenção em função da temperatura para os enantiômeros 1 (a) e 2 (b). Conc = 1 mg/mL, T = 30, 35 e 40°C, FM = CO ₂ + 14% metanol, P = 160 bar, V _{inj} = 50 µL.	87
Figura 4.7.	Perfis calculados (—) e experimentais (—) a partir da isoterma de Langmuir não-competitivo, para 100 µL (a) e 200 µL (b).	89
Figura 4.8.	Perfis calculados (—) e experimentais (—) a partir da isoterma de Langmuir competitivo, para 100 µL (a) e 200 µL (b).	89
Figura 4.9.	Perfis calculados (—) e experimentais (—) a partir da isoterma de Langmuir competitivo com denominadores diferentes para cada enantiômero, para 100 µL (a) e 200 µL (b).	90
Figura 4.10.	Produtividade em relação aos enantiômeros S do mitotano como função da concentração de alimentação da mistura racêmica para volume de injeção de 100 µL, considerando-se três percentuais de pureza superiores à 85%.	93
Figura 4.11.	Recuperação em relação aos enantiômeros S do mitotano como função da concentração de alimentação da mistura racêmica para volume de injeção de 100 µL, considerando-se três percentuais de pureza superiores à 85%.	93

Figura 4.12.	Consumo de solvente em relação aos enantiômeros S do mitotano como função da concentração de alimentação da mistura racêmica para volume de injeção de 100 μ L, considerando-se três percentuais de pureza superiores à 85%.	94
Figura 4.13.	Produtividade em relação aos enantiômeros S do mitotano como função da concentração de alimentação da mistura racêmica para volume de injeção de 200 μ L, considerando-se três percentuais de pureza superiores à 85%.	94
Figura 4.14.	Recuperação em relação aos enantiômeros S do mitotano como função da concentração de alimentação da mistura racêmica para volume de injeção de 200 μ L, considerando-se três percentuais de pureza superiores à 85%.	95
Figura 4.15.	Recuperação em relação aos enantiômeros S do mitotano como função da concentração de alimentação da mistura racêmica para volume de injeção de 200 μ L, considerando-se três percentuais de pureza superiores à 85%.	95
Figura 4.16.	Produtividade em relação aos enantiômeros R do mitotano como função da concentração de alimentação da mistura racêmica para volume de injeção de 100 μ L, considerando-se três percentuais de pureza superiores à 85%.	97
Figura 4.17.	Recuperação em relação aos enantiômeros R do mitotano como função da concentração de alimentação da mistura racêmica para volume de injeção de 100 μ L, considerando-se três percentuais de pureza superiores à 85%.	97
Figura 4.18.	Consumo de solvente em relação aos enantiômeros R do mitotano como função da concentração de alimentação da mistura racêmica para volume de injeção de 100 μ L, considerando-se três percentuais de pureza superiores à 85%.	98
Figura 4.19.	Produtividade em relação aos enantiômeros R do mitotano como função da concentração de alimentação da mistura racêmica para volume de injeção de 200 μ L, considerando-se três percentuais de pureza superiores à 85%.	98
Figura 4.20.	Recuperação em relação aos enantiômeros R do mitotano como função da concentração de alimentação da mistura racêmica para volume de injeção de 200 μ L, considerando-se três percentuais de pureza superiores à 85%.	99
Figura 4.21.	Consumo de solvente em relação aos enantiômeros R do mitotano como função da concentração de alimentação da mistura racêmica para volume de injeção de 200 μ L, considerando-se três percentuais de pureza superiores à 85%.	99

Lista de Tabelas

Tabela 1.1.	Parâmetros físico-químicos de alguns compostos.	3
Tabela 3.1.	Variações de pressão, tipo e composição de co-solvente para a determinação das isotermas de equilíbrio com fase móvel supercrítica à temperatura média de 35°C.	60
Tabela 3.2.	Variações de volume dos pulsos de injeção (V_{inj}) e concentração de alimentação da mistura racêmica de mitotano (C_{alim}) para a determinação das isotermas de equilíbrio sob condições de sobrecarga utilizando como fase móvel fluido nas proximidades do ponto crítico.	62
Tabela 4.1.	Relação entre as massas injetada e calculada (mg) de mitotano.	68
Tabela 4.2.	Valores da seletividade, fatores de capacidade e resolução para os enantiômeros do mitotano assim como a densidade nas condições experimentais estudadas.	69
Tabela 4.3.	Valores das constantes de Henry para os enantiômeros do mitotano nas condições experimentais estudadas.	78
Tabela 4.4.	Parâmetros correspondentes às Equações (25) e (26) a 80 e 160 bar, para diferentes solventes modificadores.	79
Tabela 4.5.	Número de pratos a diferentes vazões de trabalho medidas na coluna.	80
Tabela 4.6.	Parâmetros A , B e C da equação de van Deemter para os enantiômeros do mitotano.	82
Tabela 4.7.	Coefficientes de dispersão axial e de transferência de massa global para os enantiômeros do mitotano.	82
Tabela 4.8.	Parâmetros cromatográficos para a enantioseparação do mitotano nas condições mais promissoras e a diferentes temperaturas.	83
Tabela 4.9.	Parâmetros de Gibbs-Helmholtz para a enantioseparação do mitotano.	85
Tabela 4.10.	Parâmetros termodinâmicos para a enantioseparação do mitotano.	86
Tabela 4.11.	Parâmetros dos modelos de isotermas.	90
Tabela 4.12.	Condições de operação para diferentes concentrações de alimentação de mitotano racêmico variando-se a pureza, para volume de injeção de 100 μ L.	92
Tabela 4.13.	Condições de operação para diferentes concentrações de alimentação de mitotano racêmico variando-se a pureza, para volume de injeção de 200 μ L.	96
Tabela 4.14.	Valores das porosidades de cada coluna envolvida no processo de separação por LMS.	101
Tabela 4.15.	Valores das constantes de Henry para cada enantiômero do mitotano em cada uma das colunas envolvidas no processo de separação por LMS.	101
Tabela 4.16.	Propriedades do sistema LMS de enantioseparação.	103
Tabela 4.17.	Valores dos parâmetros operacionais projetados para a completa enantioseparação do mitotano através do LMS.	103
Tabela 4.18.	Valores das variáveis de desempenho projetadas e obtidas a partir dos dados experimentais para a enantioseparação do mitotano.	104

Lista de Símbolos

a'	Parâmetro da equação de Peng-Robinson relacionado com a força de atração intermolecular
A	Coeficiente da equação de van Deemter
A_i	Parâmetro da isoterma para dado componente i
A_R	Área a curva relativa ao enantiômero R
A_S	Área a curva relativa ao enantiômero S
b'	Parâmetro da equação de Peng-Robinson relacionado com ao volume das moléculas
$b_{ns,i}$	Constante de equilíbrio do componente i para a adsorção nos sítios não-seletivos
$b_{s,i}$	Constante de equilíbrio do componente i para a adsorção nos sítios enantiosseletivos
B	Coeficiente da equação de van Deemter
B_i	Parâmetro da isoterma para dado componente i
BB_i	Parâmetro da isoterma para dado componente i
co-solvente	Álcool utilizado como solvente modificador
C	Coeficiente da equação de van Deemter
C_{alim}	Concentração de alimentação da mistura racêmica
C_{fs}	Concentração do soluto na fase sólida
C_{fm}	Concentração do soluto na fase móvel
C_i	Concentração do soluto i na fase fluida
C_i^c	Concentração calculada no ponto i
C_i^e	Concentração experimental no ponto i
C_{inj}	Concentração injetada
C_m	Concentração do modificador
Conc	Concentração
CSolv	Consumo de solvente
d_i	Constante empírica envolvida na descrição da constante de Henry
d_p	Diâmetro das partículas
D_{ap}	Coeficiente de dispersão aparente
D_L	Coeficiente de dispersão axial
D_M	Difusividade molecular
$f_{i,j}$	Parâmetro correspondente à diferença entre o fluxo mássico efetivo de um dado componente i com o líquido e o fluxo mássico efetivo do mesmo com o sólido adsorvente em uma dada seção j da unidade LMV
H	Altura equivalente a um prato
He_i	Constante de Henry
He_i^0	Constante de Henry relacionada à densidade na condição de referência
K	Fator de retenção
k_{ij}	Parâmetro de interação binária
k_{cm}	Compressibilidade isotérmica da fase móvel
k_m	Coeficiente de transferência de massa global
K	Constante de equilíbrio de adsorção
l_{ij}	Parâmetro de interação binária
L	Comprimento da coluna
m_i	Expoente empírico função do volume molar do soluto na fase fluida
m_j	Razão entre as vazões efetivas de líquido e de sólido na seção j da

	unidade LMV
m_{inj}	Massa injetada
m_{recup}	Massa recuperada
n_i	Concentração do soluto i no adsorvente
$(n_i)_j$	Fluxo mássico efetivo de um dado componente i na seção j
$(n_i)_j^L$	Fluxo mássico efetivo de um dado componente i com o líquido na seção j
$(n_i)_j^S$	Fluxo mássico efetivo de um dado componente i com o sólido adsorvente na seção j
N	Número de pratos
NE	Número de experimentos
NY	Número de respostas em cada experimento
P	Pressão
P_c	Pressão crítica
Pur	Pureza
Pe	Número de <i>Peclet</i>
Produtiv	Produtividade
q_i	Quantidade adsorvida do componente i na fase sólida
q_{ns}	Capacidade de saturação dos sítios não seletivos
q_s	Capacidade de saturação dos sítios enantiosseletivos
Q	Vazão de fase móvel
Q_D	Vazão do dessorvente do LMS
Q_E	Vazão do extrato do LMS
Q_F	Vazão de alimentação do LMS
Q_j	Vazão na seção j
Q_{jLMS}	Vazão na seção j do LMS
Q_{jLMV}	Vazão na seção j do LMV
$(Q_L)_{ef}$	Vazão efetiva de líquido na seção j da unidade LMV
Q_R	Vazão de refinado do LMS
Q_S	Vazão volumétrica de sólido
$(Q_S)_{ef}$	Vazão efetiva de sólido na seção j da unidade LMV
Q_1	Vazão volumétrica na zona 1 LMS
Q_2	Vazão volumétrica na zona 2 LMS
Q_3	Vazão volumétrica na zona 3 LMS
Q_4	Vazão volumétrica na zona 4 LMS
r_i	Diferença entre concentrações calculada e experimental no ponto i
r^2	Coeficiente de correlação
R	Constante dos gases ideais
Recup	Recuperação
Rs	Resolução do sistema
SQ	Soma quadrática
T	Tempo
t_m	Tempo de retenção do pulso de traçador
$t_{R,i}$	Tempo de retenção do soluto i
t_0	Tempo de retenção do composto não retido à fase estacionária
t^*	Tempo decorrido entre duas trocas de posições na unidade LMS
T	Temperatura
T_c	Temperatura crítica
T_{iso}	Temperatura isoenantiosseletiva
U	Velocidade intersticial da fase móvel
u_0	Velocidade superficial da fase móvel
V_{ads}	Volume de adsorvente

V_{col}	Volume da coluna
V_{inj}	Volume de injeção
V_M	Volume molar da fase móvel
$\overline{V_M^\infty}$	Volume parcial molar do soluto na fase móvel à diluição infinita
$\overline{V_M}$	Volume parcial molar do soluto na solução saturada
$\overline{V_M^\infty}$	Volume parcial molar do soluto na fase móvel à diluição infinita
V_{mt}	Volume morto extracoluna
V_s	Volume molar do soluto na fase estacionária
$\overline{V_s}$	Volume parcial molar do soluto adsorvido na superfície da fase sólida
$\overline{V_s^\infty}$	Volume parcial molar do soluto na fase sólida à diluição infinita
V_{sol}	Volume molar do soluto sólido
V_{TM}	Volume total da fase móvel
V_{TS}	Volume total da fase sólida
V_y	Matriz de variância-covariância dos erros experimentais
w_h	Largura do pico a meia altura
y_{mod}	Vetor contendo os valores calculados a partir do modelo
y_{exp}	Vetores contendo os dados experimentais
y_M	Fração molar do soluto na fase móvel
y_s	Fração molar do soluto na fase sólida
Y	Solubilidade do soluto na fase móvel
X	Composição da fase móvel
X_M	Composição na fase móvel
X_s	Composição na fase sólida
Z	Distância ao longo da coluna
ΔG^0	Energia de Gibbs do soluto
ΔH^0	Entalpia de adsorção
ΔS^0	Entalpia de adsorção
$\Delta\Delta G^0$	Variação da energia livre de Gibbs
$\Delta\Delta H^0$	Variação da entalpia de adsorção
$\Delta\Delta S^0$	Variação da entropia de adsorção

Símbolos gregos

α	Fator de separação
α'	Parâmetro da Equação de Peng-Robinson
$\beta_{M,T}$	Compressibilidade isotérmica da fase móvel como fluido puro
$\beta_{S,T}$	Compressibilidade isotérmica da fase sólida saturada com a fase móvel fluida
ε	Porosidade do leito
ε_T	Porosidade total do leito
ε_p	Porosidade da partícula
φ_M^∞	Coefficiente de fugacidade do soluto na fase móvel
μ_s^∞	Potencial químico do soluto na fase sólida à diluição infinita
μ_n	n -ésimo momento
γ_1	Parâmetro 1 da equação da dispersão axial
γ_2	Parâmetro 2 da equação da dispersão axial

ϕ	Razão entre o volume de fase estacionária e volume de vazios da coluna.
ρ	Densidade (g/cm ³)
ρ_c	Densidade crítica (g/cm ³)
ρ_m	Densidade molar da fase móvel (gmol/cm ³)
ρ_s	Densidade molar a fase sólida (gmol/cm ³)
σ^2	Variância dos erros experimentais
ω_s	Fração mássica da fase móvel fluida na fase sólida
ξ_M	Expansividade da mistura em relação à fase móvel
ξ_S	Expansividade da mistura em relação à fase sólida

Capítulo 1

Introdução

1.1. Considerações gerais

Quiralidade é um fenômeno que permeia o universo, sendo uma característica da maioria dos processos biológicos naturais. Os avanços na tecnologia quiral e a habilidade de produzir compostos puros enantiomericamente têm um importante impacto no projeto de síntese, pesquisa e desenvolvimento de drogas e nas estratégias e políticas das indústrias farmacêuticas (AGRANAT & CANER, 1999). Drogas quirais, agroquímicas, aditivos em alimentos e fragrâncias representam classes de compostos de elevado potencial econômico e o interesse no estudo dessas classes tem crescido bastante nas últimas duas décadas, sendo a indústria farmacêutica a principal responsável pelo grande número de pesquisas (WENDA & RAJENDRAN, 2009).

A quiralidade dos compostos químicos, especialmente dos compostos terapêuticos, é um tema muito importante do ponto de vista farmacológico, farmacocinético, toxicológico e nos órgãos fiscais de controle de qualidade de medicamentos (SINGH *et al.*, 2006). A mistura equimolar de dois enantiômeros é denominada forma racêmica ou racemato e é opticamente inativa já que, se misturados os dois enantiômeros, a rotação da luz polarizada causada pelas moléculas de um dos isômeros é exatamente anulada por uma rotação igual e de sinal contrário, causado por um número igual de moléculas do outro (PAIVA, 2006). Enantiômeros, por sua vez, são estruturas não idênticas nas quais a molécula apresenta a geometria e a disposição espacial de seus átomos iguais à imagem especular, não sobreponível, do seu par complementar que apresentam a maioria de suas propriedades físicas idênticas e, quimicamente, demonstram comportamentos diferentes somente em ambientes quirais (ROMERO, 1998).

A importância da quiralidade dos fármacos racêmicos advém da diferença que os dois enantiômeros possam apresentar nos processos de absorção, distribuição,

metabolização e excreção de forma estereosseletiva, já que os organismos vivos são ambientes quirais. Está estabelecido ainda que, em várias situações, a atividade farmacológica está restrita a um dos enantiômeros enquanto o outro pode ser responsável pelas reações adversas (GUBITZ & SCHMID, 2006; ALI & ABOUT-ENEIN, 2002).

Do ponto de vista do consumidor, a administração de um fármaco na forma de mistura racêmica apresenta como desvantagem o aumento da dose a ser utilizada, pois somente metade dela poderá ter o efeito farmacológico desejado além de que, o paciente ingere a cada dose, 50% de uma substância química indesejada (COELHO, 2001). Dessa forma, as prováveis vantagens do uso de drogas enantiomericamente puras são: a redução da dose total administrada, a maior eficácia da relação dose-resposta e a minimização da toxicidade a partir do outro enantiômero (ROSA, 2005).

Assim, o reconhecimento e a possibilidade de desenvolvimento de isômeros isolados passaram a ser uma abordagem de importância para a indústria farmacêutica de modo a garantir segurança e eficiência dos fármacos disponíveis e em desenvolvimento. Tais diferenças mostram, seguidamente, propriedades farmacodinâmicas e farmacocinéticas antagônicas como consequência de interações com receptores biológicos que são altamente específicos (SINGH *et al.*, 2006; BONATO *et al.*, 2005).

Enantiômeros puros podem ser obtidos por síntese assimétrica ou resolução racêmica, sendo esta última menos complexa e capaz de produzir ambos os compostos, fato este essencial para testes biológicos. A resolução racêmica inclui a separação enzimática e a formação de diastereoisômeros que possam ser separados por cristalização ou cromatografia (separação indireta) e separação cromatográfica usando fase estacionária quiral (FEQ) (KOZMA, 2002; FRANCOCTTE, 2001; AHUJA, 1996).

Os métodos cromatográficos baseados em FEQ fornecem ambos os enantiômeros com elevado grau de pureza óptica, em um tempo relativamente curto e têm sido os mais utilizados para separar, isolar e analisar enantiômeros, particularmente nos estágios de formulação e desenvolvimento de novos equipamentos, desde HENDERSON & RULE (1939) (GUIOCHON, 2002; FRANCOCTTE, 2001). Na ausência de um elemento quiral externo, enantiômeros não podem ser diferenciados, contudo, em um ambiente quiral podem ser considerados compostos fisicamente distintos e, uma vez que possuindo arranjo configuracional oposto de seus átomos no espaço, podem interagir diferentemente com um ambiente quiral (BARREIRO *et al.*, 1997). Esse tipo de separação está fundamentada na diferença de energia entre os complexos diastereoisoméricos

temporários formados entre o seletor quiral e os enantiômeros do soluto. A diferença em estabilidade destes complexos transitórios levam a diferentes tempos de retenção dos enantiômeros na coluna e o que forma o complexo menos estável elui primeiro em uma coluna cromatográfica (AHUJA, 2000).

Além disso, a utilização de um eluente baseado em fluidos no estado supercrítico conduz a um sistema experimental com alta eficiência, reduzindo o uso de solventes orgânicos o que torna o processo mais “verde” (W ENDA, 2009). Apresentam alto poder de solvatação de substâncias apolares quando comparada à solubilidade em condições normais de temperatura e pressão em solventes orgânicos e sua baixa viscosidade em relação aos gases provoca menor queda de pressão na coluna favorecendo a percolação e permitindo que partículas de tamanhos menores possam ser usadas no leito empacotado, o que gera maior eficiência para a coluna (COX, 2005; JUSFORGUES & SHAIMI, 1998; WILLIAMS & SANDER, 1997; WHATLEY, 1995).

Na maioria das separações no estado supercrítico, o CO₂ tem sido mantido como fluido, sobretudo porque requer baixas condições de temperatura e pressão para manter-se neste estado, além de não ser explosivo ou tóxico, comparado com outros fluidos, como mostra a Tabela 1.1 (COX, 2005).

Tabela 1.1. Parâmetros físico-químicos de alguns compostos.

Fluido	T _c (K)	P _c (atm)	V _c (m ³ /kgmol)
Dióxido de carbono	304,2	7,39	0,0943
Água	647,3	22,09	0,0568
Amônia	405,5	11,28	0,0724
Etanol	516	6,38	0,1673
Metanol	512,5	4,64	0,0993

T_c = temperatura crítica, P_c = pressão crítica, V_c = densidade crítica.

Conhecida a natureza apolar do CO₂ e a modesta solubilidade de solutos polares neste, a adição de modificadores polares como alcoóis é uma alternativa para aumentar a solubilidade desses solutos polares na fase móvel (RAJENDRAN *et al.*, 2005a).

Como ocorre para outros medicamentos, é possível que exista diferença farmacológica entre os enantiômeros do mitotano (o,p'-diclorodifenildicloroetano), um fármaco quiral comercializado na forma de mistura racêmica que tem sido extensivamente utilizado em adultos desde o início da década de 80 como adjuvante no tratamento do

carcinoma adrenocortical (CAC), tumor da camada exterior da glândula supra-renal, quando não operável, metastizado ou recorrente, de alta incidência no sul do Brasil.

ZANCANELLA (2008), em pesquisas pré-clínicas realizadas na Universidade Federal do Paraná, revelou que o S-mitotano é quatro vezes mais potente que o R-mitotano. Esses diferentes efeitos que os enantiômeros podem apresentar frente aos sistemas biológicos estão relacionados à necessidade de obtê-los separadamente para dar continuidade aos testes clínicos, o que a cromatografia com fase estacionária quiral (FEQ) combinada a um eluente supercrítico, pode promover através de um sistema experimental de alta eficiência.

1.2. Motivação

Durante a última década, a tendência para o desenvolvimento de substâncias estereoquimicamente puras passou a priorizar a identificação das diferenças na atividade biológica, sobretudo após a tragédia ocorrida com a talidomida. A partir de então, o estudo da influência do arranjo espacial dos átomos nas moléculas na interação com macromoléculas biológicas e o quanto isso influencia os processos bioquímicos, fisiológicos e farmacológicos tornou-se imprescindível.

De acordo com o estado da arte do desenvolvimento de metodologias para a separação enantiomérica, a cromatografia com fase estacionária quiral tem sido uma alternativa para a separação dos enantiômeros com rapidez e tem se mostrado como uma ferramenta bem estabelecida. Além disso, mostra que a combinação de uma técnica cromatográfica com a utilização de um eluente supercrítico conduz a um sistema experimental com alta eficiência, diminuindo ou mesmo evitando o uso de solventes orgânicos que provocam impacto ambiental. Em escala preparativa a aplicação desse método para a produção de materiais opticamente ativos em quantidades favoráveis para testes biológicos, estudos toxicológicos e até mesmo testes clínicos ganhou larga aceitação.

Através destas constatações em meio à literatura recente, a separação da mistura racêmica por cromatografia preparativa é uma alternativa bem fundamentada para disponibilizar as formas enantiomericamente puras do mitotano para posteriores testes clínicos e averiguação da atuação destas formas no organismo.

Pioneiramente, o Laboratório de Biosseparação da Faculdade de Engenharia Química da UNICAMP desenvolveu um trabalho de avaliação das condições de operação

para a separação dos enantiômeros do mitotano para posteriores análises biológicas utilizando a coluna quiral *Kromasil CHI-TBB* e hexano/acetato de etila como fase móvel. Diante das dificuldades inicialmente encontradas, como o alto consumo de solvente devido ao baixo limite de solubilidade desse antineoplásico em solventes orgânicos, as altas diferenças de pressão necessárias à percolação da fase móvel através da coluna decorrente da alta viscosidade da fase móvel e ainda a obtenção final de soluções com volumes relativamente grandes de solvente propõe-se a substituição da fase móvel líquida por uma fase móvel composta por fluido supercrítico.

Nesse contexto pré-estabelecido, se inserem os avanços das metodologias experimentais e das análises das condições de equilíbrio termodinâmico e de transferência de massa na cromatografia preparativa quiral com fluido supercrítico como contribuições a serem fornecidas com o desenvolvimento deste trabalho. Ainda, soma-se a utilização de uma unidade de separação cromatográfica funcionando pioneiramente com fluido supercrítico como eluente. Dessa forma, será possível prover as formas S e R do mitotano com elevado grau de pureza ótica para a realização de testes *in vivo*, de modo a definir a atuação individual de cada enantiômero e assim controlar ou reduzir os efeitos tóxicos desta substância durante sua utilização como adjuvante no tratamento do carcinoma adrenocortical.

1.3. Objetivos

O presente trabalho se propõe a avaliar a separação cromatográfica dos enantiômeros do mitotano utilizando as fases estacionárias quirais *Kromasil CHI-TBB* quando utilizada a cromatografia com fluido supercrítico e *Chiralpak AD* quando utilizada a cromatografia líquida, visando alcançar os seguintes objetivos principais:

- Avaliar o equilíbrio de adsorção dos enantiômeros do mitotano em diferentes fases móveis, líquida e supercrítica a diferentes pressões e em condições diluída e concentrada;
- Projetar e comparar condições operacionais para a separação dos enantiômeros do mitotano em sistemas em batelada e leito móvel simulado.

Para atingir esses objetivos, as seguintes metas foram definidas:

- Validar o aparato experimental para utilização de CO₂ nas proximidades do ponto crítico;

- Reconhecer os fenômenos de transferência de massa, hidrodinâmicos e termodinâmicos na separação cromatográfica para a condição diluída;
- Avaliar as isotermas de equilíbrio através do método inverso a partir dos perfis de eluição em condições de sobrecarga;
- Avaliar os pontos ótimos de operação para sistema em batelada e LMS em relação às variáveis de desempenho, produtividade, recuperação, pureza e consumo de solvente.

Capítulo 2

Revisão Bibliográfica

2.1. Mitotano

O carcinoma adrenocortical (CAC) é um tipo de tumor do córtex adrenal, na camada exterior da glândula supra-renal, considerado raro, ocorrendo a cada ano 25 novos casos infantis nos EUA. No sul do Brasil a incidência pediátrica é singular, 10 a 15 vezes mais casos são diagnosticados a cada ano do que nos EUA e na Europa, sobretudo nos estados do Paraná e São Paulo, vitimando de 2,9 a 4,2 novos casos por milhão de pessoas (RIBEIRO *et al.*, 2000). Esse aumento está associado a uma mutação hereditária do gene *Tp53*, detectada em todas as crianças acometidas pelo CAC, contudo não são encontrados na literatura científica explicações para o surgimento de tal mutação e para a alta incidência no país (PIANOVSKI *et al.*, 2006).

O CAC pode desencadear quatro síndromes diferentes, sendo elas a virilização (masculinização), a *Síndrome de Cushing*, uma forma mista (geralmente associação de virilização e *Cushing*) e ainda a ausência de excessos hormonais, quando se observa apenas um efeito de massa (tumor palpável) (KOPF *et al.*, 2001).

O mitotano (o,p'-diclorodifenildicloroetano) é um agente quimioterápico oral indicado para esse tipo de tumor quando não ressecável completamente, recidivado ou resultante de doença residual após cirurgia, cuja primeira terapia foi relatada em 1960, por VAN BUREN & BERGENSTAL (LIM *et al.*, 1990; WOOTEN & KING, 1993; BERRUTI *et al.*, 1998; KASPERLIK-ZALUSKA, 2000; KOPF *et al.*, 2001).

O quimioterápico possui propriedades adrenolíticas dependentes da ativação metabólica, resultando na geração de intermediários reativos ou na formação de o,p'-DDA (1,1-o,p'-diclorodifenilacético) (ANDERSSSEN *et al.*, 1999; KASPERLIK-ZALUSKA *et al.*, 1995; HAAK *et al.*, 1994; VAN SLOTEN *et al.*, 1984) e ocasiona atrofia citotóxica das células das glândulas adrenais, normais e neoplásicas, em parte através da destruição de mitocôndrias (HUTCHISON & SHAHAN, 2004).

Estudos com o mitotano têm sido realizados em adultos, sendo o relato de ensaios clínicos envolvendo crianças reduzido sem que haja ainda um consenso com relação à posologia para a faixa pediátrica (DE LEÓN *et al.*, 2002).

Nas concentrações consideradas terapêuticas, as reações adversas ao mitotano parecem ser inevitáveis. Em 1984, VAN SLOOTEN *et al.* avaliaram os níveis tóxicos e não-tóxicos da droga monitorando a concentração plasmática e relacionando-a aos efeitos terapêuticos. Dez anos após, HAAK *et al.* (1994) confirmaram estes dados e têm sido referência na monitoração das concentrações plasmáticas de mitotano. Cerca de 14 µg/mL da droga foram necessários para que sua ação terapêutica fosse exercida plenamente. Contudo, níveis excedendo 20 µg/mL foram associados com toxicidades neuromusculares. Segundo TERZOLO *et al.* (2000) a toxicidade do mitotano tem sido o maior limitante no tratamento do CAC porque de acordo com BOLLEN & LANSER (1992), a incidência, a severidade e a persistência desses efeitos tóxicos dificultam o tratamento, provocando reduções nas doses, interrupções ou até cessação do tratamento.

O mitotano possui nome comercial *Lysodren* e é produzido pela *Bristol-Myers Squibb*, sendo comercializado na forma de comprimidos contendo 500 mg de princípio ativo. Seu fabricante recomenda, sem especificação de faixa etária, que o tratamento seja iniciado com doses de 2 a 6 g/dia, distribuídas entre 3 e 4 vezes, elevando até 9 a 10 g/dia de acordo com a resposta clínica e os efeitos adversos observados. (HEILMANN *et al.*, 2002).

Devido a sua característica lipofílica, inicialmente o mitotano se acumula em tecido adiposo e aparece em baixas concentrações no sangue (TERZOLO *et al.*, 2000; SCHULICK & BRENNAN, 1999), podendo ser necessários vários meses para a saturação da gordura. Este fármaco atravessa a barreira hemato-encefálica (BOLLEN & LANSER, 1992), depositando-se no tecido gorduroso cerebral. Após a administração oral de mitotano, apenas 60% da dose é absorvida, e desta parte, entre 20 e 30% é armazenada nos tecidos, principalmente adiposo. Uma concentração plasmática máxima é obtida em três a cinco horas e um equilíbrio de mitotano entre o plasma e os tecidos é alcançado em 12 horas (EUROPEAN MEDICINES AGENCY, 2007; HUTCHISON & SHAHAN, 2004). Como reações adversas às doses elevadas administradas, 80% dos pacientes apresentam problemas gastrointestinais como anorexia, náuseas, vômitos e diarreia e 40% toxicidades neurológicas, como depressão do sistema nervoso central, tontura,

vertigem, cefaléia, confusão e fraqueza (HUTCHISON & SHAHAN, 2004; BOLLEN & LANSER, 1992).

O emprego de mitotano pode ser mantido enquanto houver evidências de redução do tamanho do tumor e o paciente puder suportar as reações adversas, contudo, na literatura, não se encontra uma indicação formal ou um consenso sobre a duração do tratamento com esse fármaco (HUTCHISON & SHAHAN, 2004). No Brasil, o Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná (HC-UFPR) e no Hospital Erasto Gaertner - Liga Paranaense de Combate ao Câncer (HEG- LPCC), o mitotano é utilizado por um período mínimo de 18 meses, para pacientes em remissão da doença, de acordo com a resposta clínica e as reações adversas.

ABRAHAM *et al.* (2002) perceberam que, após a administração de mitotano por tempo prolongado, pequenas doses diárias são suficientes para manter as concentrações entre 10 e 20 µg/mL e, segundo estes autores, alguns pacientes necessitam de 0,5 a 1 g de mitotano. Doses menores reduzem significativamente as reações adversas, tornam os tratamentos mais toleráveis e reduzem as interrupções e cessações. DICKSTEIN *et al.* (1998) e TERZOLO *et al.* (2000) sugeriram que esquemas terapêuticos com baixas doses de mitotano, mantidos por longos períodos, podem ser viáveis e podem trazer melhoras à qualidade de vida do paciente, com minimização dos efeitos adversos e maior adesão ao tratamento.

A estrutura da molécula do mitotano (Figura 2.1) apresenta um carbono quiral representado pelo asterisco, pressupondo-se, dessa forma, a existência de enantiômeros R e S do o,p'-diclorodifenildicloroetano. Em muitos casos, a ocorrência de formas enantioméricas provoca ações farmacológicas distintas e conflitantes no sistema fisiológico quando comparado aos efeitos observados por cada enantiômero puro e o fato de medicamentos serem fornecidos na forma de mistura racêmica pode ser extremamente preocupante do ponto de vista da saúde. Depois da tragédia ocorrida com a talidomida, em razão do enantiômero S apresentar efeitos teratogênicos, levando, por falta de conhecimento das diferenças toxicológicas entre os enantiômeros, à má formação de milhares de fetos, novos modelos de estudos para fármacos quirais foram desenvolvidos e, a partir de então, passou-se a estudar a influência do arranjo espacial dos átomos nas moléculas na interação com macromoléculas biológicas e o quanto isso influencia os processos bioquímicos, fisiológicos e farmacológicos (ORLANDO *et al.*, 2007; CALDWELL, 1995).

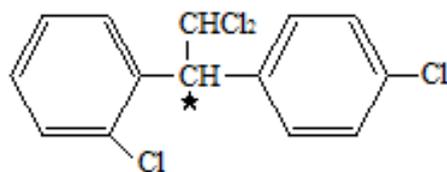


Figura 2.1. Estrutura química do mitotano (o,p' DDD), cujo carbono quiral está identificado com ★.

BUSER & MÜLLER (1995) separaram os enantiômeros do mitotano, testando as colunas quirais de α , β e γ -ciclodextrina permetilada com metanol e água na proporção 80:20 (% v/v) e acetato de trietilamina pH 4,5 como fase móvel, a uma vazão de 0,8 mL/minuto, à temperatura ambiente. Para a última coluna, obtiveram uma resolução de 4,7, satisfatória entre os enantiômeros do mitotano.

ALI & ABOUT-ENEIN (2002) utilizaram três diferentes colunas quirais de polissacarídeo para a resolução dos enantiômeros do mitotano, da mesma forma que na pesquisa anterior, não aplicados a amostras biológicas. Com a coluna *Chiralpak*[®] AD-R uma resolução modesta, 0,6, foi obtida, utilizando acetonitrila e isopropanol na proporção de 50:50 (% v/v) como mistura eluente, a 1 mL/min e 23°C.

DIAS (2007) realizou pioneiramente, no Laboratório de Biosseparação da Faculdade de Engenharia Química da Unicamp, investigações científicas a respeito da separação dos enantiômeros do mitotano através da cromatografia líquida de alta eficiência. O uso da coluna empacotada com fase estacionária quiral *Kromasil CHI-TTB* associado à fase móvel hexano/acetato de etila na proporção 95:5 (%v/v) foi promissor na enantioseparação do racemato cujo R-(+)-mitotano foi o composto mais retido pela coluna quiral.

ZANCANELLA (2008) utilizou os enantiômeros cedidos pelo Laboratório de Biosseparação da Faculdade de Engenharia Química da Unicamp para avaliar o metabolismo enantiosseletivo das configurações levógira e dextrógira do mitotano, através de ensaios qualitativos realizados com amostras de plasma de pacientes. A presença de excesso enantiomérico para o (R)-(+) sugeriu que o (S)-(-) foi metabolizado em maior proporção e assim, postulou-se a existência de caminhos metabólicos diferenciais para os enantiômeros do mitotano, ainda merecendo investigações as possíveis diferenças terapêuticas e tóxicas dos mesmos e, esse fato, pode caracterizar inicialmente o primeiro relato conhecido sobre essa atuação.

2.2. Sistema cromatográfico linear

A cromatografia consiste em um método físico-químico de separação fundamentado na migração diferencial dos componentes de uma mistura, que ocorre devido a diferentes interações desses compostos entre duas fases imiscíveis, a fase móvel e a fase estacionária. A grande variedade de combinações entre ambas as fases, móvel e estacionária, torna a cromatografia uma técnica muito versátil e de alta aplicabilidade (CASS & DEGANI, 2001).

Na cromatografia linear, as concentrações de equilíbrio do soluto na fase estacionária e na fase móvel são proporcionais, ou seja, as isotermas de equilíbrio são retas partindo da origem. Os tempos de retenção são independentes da concentração e do volume de amostra e a altura do pico cromatográfico é proporcional à quantidade de cada componente na amostra injetada (GUIOCHON *et al.*, 1994).

Contudo, na cromatografia não-linear, a concentração de um componente na fase estacionária em equilíbrio não é proporcional a sua concentração na fase móvel. Esta é a situação encontrada na grande maioria das aplicações cromatográficas em escala preparativa. Os problemas da cromatografia não-linear são extremamente complexos devido à interdependência dos perfis individuais, causados pela dependência da quantidade de cada componente na solução contendo as várias espécies (GUIOCHON *et al.*, 1994).

Quando se considera a sobrecarga da coluna, dois procedimentos podem ser descritos: a sobrecarga de concentração e a sobrecarga de volume. O primeiro considera o soluto muito solúvel na fase móvel e é realizado com volume de injeção constante de soluções em concentrações crescentes. Com esse aumento da concentração da solução injetada é esperado que as bandas cromatográficas sejam distorcidas podendo também ocorrer o aumento das suas caudas. O último considera o soluto com solubilidade baixa ou até intermediária na fase móvel. A partir de uma solução concentrada preparada para faixa de solubilidade do analito na fase móvel, volumes crescentes da mesma solução são injetados no sistema cromatográfico e, esse aumento do volume de injeção pode resultar na deformação do pico (MACHERY-NAGEL, 2000; LEE, 1993).

Parâmetros cromatográficos fornecem informações acerca da distribuição do composto entre a fase estacionária e a fase móvel e assim são úteis para a avaliação e verificação da eficiência da separação de compostos na coluna cromatográfica (SEWELL

& CLARKE, 1987). O tempo de retenção (t_R) é proporcional a força de interação de cada composto com a fase estacionária enquanto que o fator de retenção ou de capacidade (k_i) é uma medida adimensional que depende da distribuição do componente de interesse entre as fases móvel e estacionária, e pode ser definido por (SCHMIDT-TRAUB, 2005):

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

onde $t_{R,i}$ é o tempo de retenção do composto em estudo (min) e t_0 é o tempo de retenção de um composto não-retido (min).

A relação entre os fatores de retenção do componente mais retido j pelo do componente menos retido i corresponde a outro parâmetro de fundamental importância em cromatografia e é chamado de fator de separação (α) ou seletividade. Ele mede a seletividade da separação para duas bandas adjacentes e seu valor depende da espécie de fase estacionária e/ou da fase móvel, podendo assumir valores maiores ou iguais à unidade a temperaturas diferentes (SCHMIDT-TRAUB, 2005) e é definido como mostra a Equação (2):

$$\alpha_{i,j} = \frac{k_j}{k_i} \quad (2)$$

2.2.1. Método dos momentos e altura equivalente a um prato teórico

Análise dos momentos é uma ferramenta usual para determinação de coeficientes de dispersão axial e parâmetros de transferência de massa a partir de experimentos de pulsos cromatográficos com soluções diluídas (MIYABE & SUZUKI, 1992). Esta técnica consiste na análise da concentração do soluto como uma função do tempo na saída do leito fixo em resposta à concentração do soluto no pulso na entrada do leito fixo. Para soluções diluídas, a curva de equilíbrio sólido-líquido pode ser representada como uma reta conforme a Lei de Henry (GUIOCHON *et al.*, 1994).

Por definição dos momentos de uma distribuição, o n -ésimo momento do perfil de banda na saída do leito cromatográfico de comprimento $z = L$ é calculado pela Equação (3) (GUIOCHON *et al.*, 1994):

$$M_n = \int_0^{\infty} C(t, L) t^n dt \quad (3)$$

O n-ésimo momento absoluto ou normalizado é então expresso pela Equação (4) (Guiochon *et al.*, 1994):

$$\mu_n = \frac{M_n}{M_0} = \frac{\int_0^{\infty} C(t, L) t^n dt}{\int_0^{\infty} C(t, L) dt} \quad (4)$$

e o n-ésimo momento central é dado pela Equação (5):

$$\bar{\mu}_n = \frac{\int_0^{\infty} C(t, L) (t - \mu)^n dt}{\int_0^{\infty} C(t, L) dt} \quad (5)$$

O primeiro momento absoluto μ_1 , corresponde ao tempo de retenção da banda, e está relacionado com a força de ligação, isto é, com a constante de equilíbrio (RUTHVEN, 1984), representado pela Equação (6):

$$\mu_1 = t_R = \frac{L}{u_0} \left[1 + (1 - \varepsilon) \varepsilon_p \right] \quad (6)$$

Já o segundo momento central μ_2 é relacionado ao espalhamento do pico, causado por desvios do equilíbrio. Fornece informações sobre a difusão e está relacionado ao espalhamento do pico. Quando o pico cromatográfico de eluição for Gaussiano, $\bar{\mu}_2$ torna-se igual à variância σ^2 , como expresso pela Equação (7) (RUTHVEN, 1984).

$$\bar{\mu}_2 = \sigma^2 = \frac{2L}{u_0} \left\{ \frac{D_L}{u_0^2} \left[1 + \left(\frac{\varepsilon}{1 - \varepsilon} \right) \frac{1}{K} \right]^2 + \left(\frac{\varepsilon}{1 - \varepsilon} \right) \frac{1}{K k_m} \right\} \quad (7)$$

onde L é o comprimento da coluna (cm), u_0 é a velocidade intersticial ($u_0 = u/\varepsilon$) (cm/min), ε é a porosidades do leito, D_L é o coeficiente de dispersão axial, k_m é o coeficiente de transferência de massa global (min^{-1}) e K , a constante de equilíbrio, é dada pela Equação (8):

$$K = \varepsilon_p + (1 - \varepsilon_p)He \quad (8)$$

onde ε_p é a porosidade da partícula e He é a constante de Henry.

A altura equivalente a um prato teórico (*HETP*) é a medida conjunta das não-idealidades da fluidodinâmica (dispersão axial) e da resistência à transferência de massa (SCHMIDT-TRAUB, 2005). Este parâmetro avalia a eficiência de uma coluna cromatográfica sob determinadas condições de operação por unidade de tempo da coluna (SNYDER & KIRLAND, 1979). Segundo SNYDER & KIRLAND (1979), o principal objetivo na separação cromatográfica é a obtenção de pequenos valores de *HETP* com elevada eficiência de separação que é relacionada ao valor de N .

O valor de *HETP* para uma coluna cromatográfica pode ser calculado aproximadamente através da equação de van Deemter, como mostra Equação (9):

$$H = A + Bu_0 + \frac{C}{u_0} \quad (9)$$

$$A = 2\gamma_2 d_p \quad (10)$$

$$B = 2\gamma_1 D_M \quad (11)$$

$$C = 2\left(\frac{1-\varepsilon}{\varepsilon}\right)\frac{K}{k_m}\left[1 + \left(\frac{1-\varepsilon}{\varepsilon}\right)K\right]^{-2} \quad (12)$$

onde γ_1 e γ_2 são parâmetros da equação, d_p é o diâmetro das partículas (μm), D_M é a difusividade molecular, K é a constante de equilíbrio de adsorção e k_m é o coeficiente de transferência de massa global (min^{-1}).

Os três termos da Equação (9) A , B e C são coeficientes empíricos (GUIOCHON, 2002). O termo A refere-se ao alargamento dos picos devidos aos caminhos tortuosos seguidos pelas moléculas da amostra. Para minimizar este termo é necessário usar colunas com diâmetros internos pequenos, bem recheadas e partículas com tamanho pequeno e uniforme. O termo B está relacionado com a difusão molecular do soluto na

fase móvel, podendo ser minimizado trabalhando-se com a massa específica da fase móvel (COLLINS *et al.*, 2006). O termo C é uma função dos efeitos de transferência de massa do soluto entre as fases móvel e estacionária. Neste caso, vazões menos de fase móvel minimizam estes efeitos (COLLINS *et al.*, 2006).

O *HETP* fornece uma interpretação física simples dos efeitos de dispersão axial e de resistência à transferência de massa sobre o desempenho da coluna e seu conceito é válido somente quando a taxa de transferência de massa é relativamente rápida e os perfis dos picos de eluição são Gaussianos (GUIOCHON & LIN, 2003). A influência dos diferentes parâmetros de transferência de massa na eficiência global da coluna é mostrada na Figura 2.2, onde a eficiência representada pela altura de pratos é plotada versus a velocidade da fase móvel.

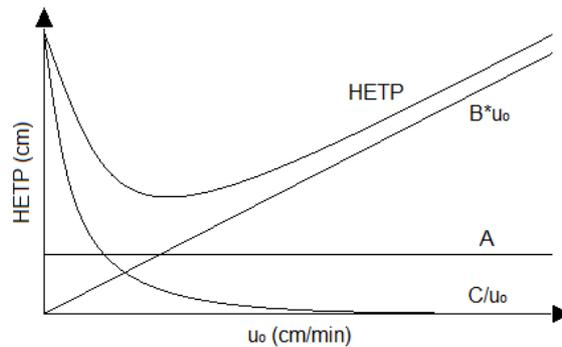


Figura 2.2. Relação entre HETP e a velocidade intersticial da fase móvel (u_0).

A curva representa, na prática, um modo de selecionar a vazão ótima de uma corrida cromatográfica. Na curva superior representa o perfil de *HETP* versus u_0 há um valor mínimo para a altura dos pratos a uma dada velocidade, a velocidade ótima. Abaixo desta, *HETP* é fortemente dependente dos efeitos de difusão (termo B) e a altas velocidades é fortemente dependente do termo de transferência de massa (termo C) (Sewell & Clarck, 1987).

Em sistemas com isoterma de adsorção linear, a eficiência da coluna cromatográfica é avaliada pela análise de *HETP*, podendo ser calculada através da Equação (13):

$$HETP = \frac{L\sigma^2}{\mu^2} = \frac{L}{N} \quad (13)$$

onde L é o comprimento da coluna (cm) e N é o número de pratos, calculado pela Equação (14) a partir de $t_{R,i}$ o tempo de retenção do soluto i (min) e w_h , a largura do pico a meia altura:

$$N = 5,54 \left(\frac{t_{R,i}}{w_h} \right)^2 \quad (14)$$

A contribuição da difusão molecular em cromatografia líquida é geralmente desprezível quando comparados com outros processos envolvidos na separação. Os efeitos da difusividade molecular são apenas perceptíveis a baixas vazões da fase móvel. Desta forma a Equação (9) pode ser representada pela equação modificada que possui a forma apresentada pela Equação (15), onde k_m é o coeficiente de transferência de massa global e K corresponde ao termo relativo ao equilíbrio de adsorção.

$$HETP = \frac{2D_L}{u_0} + 2u \left(\frac{\varepsilon}{1-\varepsilon} \right) \frac{1}{k_m K} \left[1 + \left(\frac{\varepsilon}{1-\varepsilon} \right) \frac{1}{K} \right]^{-2} \quad (15)$$

O termo D_L representa o coeficiente de dispersão axial da coluna e, segundo GUIOCHON *et al.* (1994), considera-se que a dispersão axial resulta de dois mecanismos diferentes, difusão molecular e difusão turbilhonar. Como primeira aproximação, estes efeitos se somam de forma que o coeficiente de dispersão seja representado pela Equação (16):

$$D_L = \gamma_1 D_M + \gamma_2 d_p u \quad (16)$$

em que, D_M é a difusividade molecular, γ_1 e γ_2 são as constantes geométricas ou parâmetro da equação da dispersão axial que possuem normalmente valores 0,7 e 0,5 respectivamente (GUIOCHON *et al.*, 1994).

A resolução (R_s) da separação de um sistema cromatográfico depende de três parâmetros importantes, fator de capacidade (α), seletividade (k) e eficiência da coluna (N), como expressa a Equação (17) em relação ao componente i menos retido.

$$R_s(C) = (\alpha - 1) \frac{(k_i)}{(k_i + 1)} \frac{\sqrt{N_i}}{4} \quad (17)$$

Ainda, é relevante destacar que para a otimização de sistemas de cromatografia preparativa é imprescindível fazer várias considerações desde o início do processo, com base nos parâmetros anteriores. Para garantir a eficiência do sistema, boa qualidade do empacotamento, pequeno alargamento da banda devido à dispersão axial e baixa resistência à transferência de massa devem ser necessários e a queda de pressão deve ser a menor possível de forma a permitir a operação à máxima velocidade linear.

2.3. Cromatografia quiral

Nos últimos anos, com o aumento da pressão exercida pela comunidade científica para restringir o uso de fármacos quirais em sua forma racêmica, as indústrias farmacêuticas têm se tornado, cada vez mais, interessadas em métodos para obtenção de enantiômeros puros (MIHLBACHLER *et al.*, 2002; DING *et al.*, 2004). Essa restrição advém de casos como o da talidomida, que na década de 50 era comercializada por uma indústria alemã para tratamento de infecções respiratórias, mas associada a outras substâncias passou a ser administrada como sedativo. Enquanto seu enantiômero *R* promovia o efeito terapêutico, o enantiômero *S* confirmou posteriormente ser um potencial teratogênico (SCHÜLER-FACCINI *et al.*, 2002).

A obtenção de enantiômeros puros representa um grande desafio à química moderna, devido às propriedades termodinâmicas similares dos mesmos. A separação de enantiômeros tanto em condições analíticas quanto preparativas é de importância crucial e, um grande avanço foi conseguido a este respeito, nas últimas décadas (PARK *et al.*, 2004; CASS & DEGANI, 2001). A cromatografia com fase estacionária quiral é considerada hoje ser a mais eficiente e a rota geral de obtenção de enantiômeros com elevada pureza ótica e tem sido uma ferramenta na pesquisa farmacêutica e no desenvolvimento de novas drogas (ANDERSSON & ALLENMARK, 2002).

Embora vários modos cromatográficos estejam disponíveis para a resolução de enantiômeros, a cromatografia com fluido nas proximidades do ponto crítico é mais freqüentemente usada hoje, baseada em fases estacionárias quirais, por se tratar de processos diretos, pela simplicidade na análise da pureza enantiomérica e ser de fácil extensão para escala preparativa. A resolução direta é possível desde que exista reconhecimento quiral entre a mistura enantiomérica e o seletor quiral que deve associar-se preferencialmente a um dos enantiômeros e pode estar ancorada à fase estacionária (PARK *et al.*, 2004; CASS & DEGANI, 2001).

O potencial para separação de enantiômeros através do uso de adsorventes quirais não racêmicos há muito tem sido reconhecido, desde os anos 20, com várias tentativas de adsorção enantiosseletiva usando adsorventes poliméricos quirais naturais como celulose, inclusive a observação da rotação ótica induzida em soluções racêmicas de tintas usadas para tingir lã. Em escala preparativa, a cromatografia quiral é hoje considerada a técnica mais geral e eficiente para a obtenção de enantiômeros com elevado grau de pureza ótica e tem sido uma ferramenta importante na pesquisa farmacêutica e nas fases iniciais do desenvolvimento de novas drogas (SILVA Jr. *et al.*, 2006).

HENDERSON & RULE (1939) demonstraram o potencial do método cromatográfico para a separação em escala preparativa usando fase estacionária quiral, nas primeiras tentativas com lactose e, desde então, o método sofreu um desenvolvimento espetacular devido à evolução paralela das técnicas cromatográficas e do surgimento de inúmeras fases quirais. Diferentes razões podem ser atribuídas a este forte desenvolvimento, como a importância da relação entre a estereoquímica de um composto quiral e sua atividade biológica ter sido reconhecida; em paralelo, a síntese enantiosseletiva ter sido considerada uma novidade, prometendo desafios na química orgânica e necessitando inovações e suporte analítico e o fato de em muitos casos a cromatografia ser o método mais eficiente e rápido para a preparação dos enantiômeros ou ainda, única alternativa na impossibilidade de sua síntese (FRANCOTTE & JUNKER-BUCHHEIT, 1992).

O interesse em cromatografia sub e supercrítica está baseado nas vantagens teóricas e práticas quando comparada com HPLC além de que a cromatografia quiral é a única técnica que propicia a obtenção de compostos enantiomericamente puros em grandes quantidades em relação às outras técnicas disponíveis para a resolução de enantiômeros: a química enantiosseletiva ou síntese enzimática e a resolução quiral através da derivatização, consideradas longas, caras, com relativa baixa enantiosseletividade e trabalhosas (JUZA *et al.*, 2000). Ainda, seu avanço tem sido promovido pelas exigências regulatórias relativas à pureza de drogas quirais aliado ao fato de que fluidos com fluido nas proximidades do ponto crítico têm propriedades que se adaptam unicamente a separações quirais (TERFLOTH, 2001; WILLIAMS & SANDER, 1997).

Segundo FRANCOTTE (1994), pelo menos durante a fase de testes preliminares de novas drogas quirais, a técnica de cromatografia permite acesso rápido aos enantiômeros puros e podem vantajosamente substituir a elaboração freqüentemente prolongada de uma síntese enantiosseletiva. Uma grande variedade de drogas racêmicas já tem sido separada através de fases estacionárias quirais - FEQs - cobrindo diferentes classes terapêuticas de compostos tais como analgésicos, tranqüilizantes, diuréticos, anticonvulsivos e antineoplásicos.

Sobretudo, há basicamente duas formas de separar um par de enantiômeros por cromatografia quiral. Na primeira, de forma indireta, o par de enantiômeros é convertido em um composto covalente diastereomérico através da reação com um reagente quiral e estes são separados usando-se uma fase estacionária aquiral. Já na segunda, de forma direta, os enantiômeros e seus derivados são passados através de uma coluna contendo uma fase estacionária quiral onde será promovida a separação, freqüentemente mais usado pela facilidade de operação (AHUJA, 2000).

O mecanismo de separação de enantiômeros através do uso de FEQ baseia-se em na interação seletiva enantiômero-fase estacionária. A teoria de interação dos três pontos - regra dos três pontos - idealizada por DALGLIESH em 1952 explica o reconhecimento quiral proposto para a resolução de enantiômeros assumindo que três simultâneas interações são necessárias entre o enantiômero e a FEQ. Uma delas pode ser estérica de acordo com a superfície da FEQ utilizada enquanto as outras duas necessariamente envolvem a formação de ligações de hidrogênio ou interações polares muito fortes (FORNSTEDT *et al.*, 1997). O reconhecimento quiral significa a interação preferencial de um enantiômero em relação ao outro e, quanto maior a diferença de energia entre os complexos diastereoisoméricos transitórios temporários formados pelas interações intermoleculares entre os enantiômeros e a FEQ, melhor a separação desses enantiômeros (AHUJA, 2000).

A superfície das fases estacionárias quirais contém dois tipos de sítios de adsorção, sítios tipo I e tipo II, podem ser consideradas heterogêneas (FORNSTEDT *et al.*, 1997):

- Sítios tipo I: a cinética de interação é rápida, realizam todas as possíveis interações moleculares de baixa energia entre as moléculas da substância a ser separada e os átomos ou grupamentos deles ao longo da superfície do adsorvente incluindo interações hidrofóbicas e forças dispersivas de London bem como

interações polares envolvendo forças de Debye & Keesom e pontes de hidrogênio. Como o número de interações desse tipo é muito vasto, contribuem significativamente para a retenção global;

- Sítios tipo II: realizam, no entanto, as interações seletivas responsáveis pela separação enantiomérica, sendo aceita a teoria de interação dos três pontos entre os enantiômeros e o seletor para que haja o reconhecimento quiral.

Uma fase estacionária quiral (FEQ) consiste de uma matriz aquiral, como sílica porosa com ligantes quirais unidos quimicamente ou fisicamente, por exemplo. Esses ligantes podem ser substâncias pequenas tais como fases de Pirkle, maiores como ciclodextrinas ou ainda macromoléculas, como derivados de celulose, glicopeptídeos macrocíclicos ou proteínas imobilizadas (LINDHOLM & FORNSTEDT, 2005; ARMSTRONG & ZUCOWSKI, 1994; PIRKLE & FINN, 1981). Três propriedades físicas da sílica gel são consideradas importantes: o tamanho do poro, a área superficial e o diâmetro da partícula. A eficiência da coluna aumenta à medida que se reduz o diâmetro da partícula e o tamanho do poro e a área superficial da sílica gel tendem a variar inversamente entre si, pois quanto menor o tamanho do poro, maior a área superficial (BEESLEY & SCOTT, 1998).

2.3.1. Cromatografia quiral com fluido nas proximidades do ponto crítico

No que diz respeito aos fluidos nas proximidades do ponto crítico, suas propriedades físico-químicas intermediárias a líquidos e gases, se aproximando das melhores características de cada um, como o alto poder de solvatação do líquido e a baixa viscosidade do gás, conferem vantagens quando comparados aos líquidos (RAJENDRAN, 2006; CARRILHO *et al.*, 2001). O poder solvente do fluido é uma função da sua densidade, que quanto mais alta maior seu poder de solvatação. Conseqüentemente, a uma determinada temperatura, esse poder de solvatação do fluido pode ser alterado de acordo com o que o processo requer através da escolha de uma pressão operacional apropriada e de acordo com a seletividade adequada para o aumento de escala e operação em sobrecarga. Ainda, a força do eluente é alterada pela modificação da densidade do fluido nas proximidades do ponto crítico variando-se temperatura e/ou pressão (LEE & MARKIDES, 1990).

De acordo com SIE & RJINDERS (1967), para a maioria dos solventes à pressão constante, um decréscimo do fator de retenção (k) pode ser observado aumentando-se a

temperatura desde a ambiente, devido ao aumento da solubilidade do soluto. Após a temperatura crítica, o fator de retenção aumenta consideravelmente, sobretudo para pressões próximas ao ponto crítico e, para maiores valores de pressão, a curva passa por um máximo a partir do qual retoma aos níveis observados em menores temperaturas. Tal comportamento pode ser elucidado pelo aumento do volume livre da fase móvel, reduzindo a solubilidade e levando a um desvio na partição em favor da fase estacionária, pois se elevando a temperatura, a pressão de vapor e a solubilidade do soluto aumentam e a concentração na fase estacionária decresce sendo transferida para a fase móvel e reduzindo k .

Ainda, a densidade e a solubilidade de um solvente nas proximidades do ponto crítico variam fortemente com relação à pressão e da temperatura na região crítica, alterando inclusive o processo de eluição (DOBBS *et al.*, 1987). Segundo SNYDER *et al.* (1979), para a maioria dos sistemas estudados, $\log k$ varia linearmente com a pressão até um valor próximo à pressão crítica, a partir da qual começa a decrescer. Neste ponto de maior inflexão, foi observado que temperaturas menores diminuem a volatilidade dos solutos fazendo com que tenham um maior fator de retenção a baixas pressões e, acima da pressão crítica, uma temperatura menor causa uma eluição mais rápida devido ao aumento da densidade.

Como apresentam alto poder de solvatação de substâncias apolares, a solubilidade de muitos compostos orgânicos torna-se maior em fluidos nas proximidades do ponto crítico, quando comparada à solubilidade em condições normais de temperatura e pressão, o que permite o processamento de soluções com alta concentração, contribuindo para o aumento da produtividade do processo de separação (WILLIAMS & SANDER, 1997; WHATLEY, 1995). Além disto, a baixa viscosidade dos fluidos nas proximidades do ponto crítico provoca menor queda de pressão na coluna, favorecendo a percolação através da coluna cromatográfica (JUSFORGUES & SHAIMI, 1998). Por esta razão, tamanhos menores de partículas podem ser usados no leito empacotado, o que gera maior eficiência para a coluna (COX, 2005).

Em cromatografia com fluido nas proximidades do ponto crítico, baixas temperaturas operacionais comparadas à cromatografia gasosa (CG) reduzem a probabilidade de racemização da mistura ou em FEQs, freqüentemente resultam em uma enantioseletividade melhorada. A alta difusividade dos solutos e a reduzida viscosidade

do eluente também provêem vantagens na eficiência e tempo comparada à cromatografia líquida (CL) (STRINGHAM *et al.*, 1996).

Freqüentemente CO₂ tem sido utilizado como fluido para separação nas proximidades do ponto crítico principalmente porque requer baixas condições de temperatura e pressão (T_c = 31,3°C e P_c = 72,9 bar) para manter-se nesse estado além de não ser explosivo ou tóxico, comparado a outros fluidos (COX, 2005). Entretanto, o CO₂ é um componente apolar o que compromete o poder de solvatação e separação de substâncias polares. Porém, a adição de solventes modificadores como etanol ou metanol entre outros principalmente de baixa, massa molecular, aumenta a solubilidade do soluto no meio (RAJENDRAN, 2006; COX, 2005; DEPTA *et al.*, 1999; SMITH, 1988).

Particularmente para o mitotano, embora TROTTA (2001) comente que a molécula é pouco solúvel em água, a presença de átomos de cloro confere polaridade à molécula o que evidencia a necessidade de solventes modificadores polares adicionados ao dióxido de carbono apolar.

O fato da polaridade do gás carbônico ter sido comparada freqüentemente com a do hexano, facilitou a transição da cromatografia líquida em fase normal para a supercrítica (MOURIER *et al.*, 1985). A experiência acumulada durante os últimos anos aliada as vantagens oferecidas pelos fluidos nas proximidades do ponto crítico tem confirmado a promessa inicial tornando a cromatografia com fluido nas proximidades do ponto crítico uma ferramenta confiável para processos em grande escala (JUSFORGUES & SHAIMI, 1998). Hoje, a cromatografia preparativa com fluido nas proximidades do ponto crítico pode ser vista como uma poderosa técnica de separação para a indústria.

2.4. Análise termodinâmica na adsorção

2.4.1. Condições diluídas

O estudo termodinâmico é uma estratégia que tem sido amplamente empregada para explicar o mecanismo de retenção enantiomérica em fase estacionária quiral já que o processo de separação direta dos enantiômeros *S* e *R* pode ser caracterizado pelas propriedades termodinâmicas - ΔG^0 , ΔH^0 e ΔS^0 (SCHLAUCH & FRAHM, 2001; AHUJA, 2000; FORNSTEDT *et al.*, 1997; PIRKLE, 1991).

Separações cromatográficas quirais são determinadas pela diferença de energia livre de adsorção dos enantiômeros e essa diferença pode ser calculada a partir da

seletividade, onde k_R e k_S são as constantes de associação relativas às configurações R e S do enantiômero (SCHLAUCH & FRAHM, 2001; AHUJA, 2000; SCHURIG, 1994):

$$\Delta\Delta G^0 = \Delta\Delta H^0 - T\Delta\Delta S^0 = -RT \ln \alpha = -RT \ln \frac{k_R}{k_S} \quad (18)$$

A dependência do fator de retenção k em relação à temperatura é usualmente expressa através da Equação (19) (SCHLAUCH & FRAHM, 2001):

$$\ln k = -\frac{\Delta G^0}{RT} + \ln \phi = -\frac{\Delta H^0}{R} \frac{1}{T} + \frac{\Delta S^0}{R} + \ln \phi \quad (19)$$

em que ΔG^0 é a energia molar de Gibbs do soluto, ΔH^0 e ΔS^0 são a entalpia (kJ/gmol) e a entropia (J/gmol.K) padrão de adsorção, respectivamente, R é a constante universal dos gases (0,082 atm.L/gmol.K), T a temperatura absoluta (K) e ϕ é a razão entre o volume de fase estacionária e volume de vazios da coluna.

Assumindo que ΔH^0 e ΔS^0 são constantes dentro de uma faixa de temperatura relevante, o gráfico de $\ln k$ versus $1/T$ é capaz de fornecer os valores de ΔH^0 e ΔS^0 a partir da inclinação e da interseção com o eixo da ordenada, $\Delta H^0/R$ e $\Delta S^0/R + \ln \phi$, nessa ordem. Em cromatografia quiral, entretanto, os gráficos de van't Hoff podem apresentar desvios da linearidade devido a não-homogeneidade da superfície da FEQ causada por mecanismos de retenção distintos e, como consequência, os cálculos das propriedades termodinâmicas podem ser realizados de forma errada (SCHLAUCH & FRAHM, 2001; SCHURIG, 1994).

Em analogia à equação de van't Hoff, diferentes interações entre os dois enantiômeros e a fase estacionária podem ser expressas como a diferença de energia molar para os dois enantiômeros, calculada a partir do fator de separação (α) através da Equação (20) (KÜSTERS & SPÖNDLIN, 1996):

$$\ln \alpha = -\frac{\Delta\Delta G^0}{RT} = -\frac{\Delta\Delta H^0}{R} \frac{1}{T} + \frac{\Delta\Delta S^0}{R} \quad (20)$$

onde $\Delta\Delta G^0$, $\Delta\Delta H^0$ e $\Delta\Delta S^0$ representam as diferenças de ΔG^0 , ΔH^0 e ΔS^0 para um dado par de enantiômeros respectivamente. A baixas temperaturas, a separação é controlada pelo termo entálpico, $\Delta\Delta H^0$, caso mais comum em cromatografia líquida, e é expresso pelo decréscimo na seletividade com o aumento na temperatura (SCHLAUCH & FRAHM, 2001). Se a dependência de $\ln k$ e $\ln \alpha$ versus $1/T$ (gráficos de van't Hoff) é uma relação

linear, então pode ser assumido que ΔH^0 e ΔS^0 são independentes da temperatura, os enantiômeros interagem com o seletor quiral por um mecanismo de associação simples (ROJKOVIÈOVÁ *et al.*, 2004).

A certa temperatura, a temperatura enantiosseletiva T_{iso} , o termo entálpico é compensado pelo termo entrópico, conduzindo a uma completa perda de separação quiral ($\Delta\Delta G^0=0$). Acima da T_{iso} a separação melhora com a ordem de eluição dos enantiômeros invertida e assim a enantioseletividade é dominada pelo termo entrópico (SCHLAUCH & FRAHM, 2001; AHUJA, 2000):

$$T_{iso} = \frac{\Delta\Delta H^0}{\Delta\Delta S^0} \quad (21)$$

2.4.2. Influência da pressão e composição do modificador no equilíbrio

Assumindo que a retenção do soluto reflete a distribuição deste entre as fases móvel e estacionária no estado de equilíbrio, o fator de retenção do soluto pode ser escrito também como:

$$k = \frac{C_{FS}V_{TS}}{C_{FM}V_{TM}} = \frac{y_sV_MV_{TS}}{y_MV_sV_{TM}} \quad (22)$$

onde C_{FS} e C_{FM} são as concentrações do soluto nas fases estacionária e móvel, V_{TS} e V_{TM} são os volumes totais das fases estacionária e móvel, V_s e V_M são os volumes molares e y_s e y_M são as frações molares do soluto nas fases estacionária e móvel (SUNOL *et al.*, 1994). Considerações no equilíbrio de fase permitem definir o coeficiente de fugacidade e a solubilidade do soluto na fase móvel, como descreve ROTH (2004).

Considerando-se os efeitos da pressão, pode-se obter o comportamento da retenção do soluto com a variação da mesma igualando-se o potencial químico do soluto nas fases móvel e estacionária, de acordo com SUNOL *et al.* (1996) e tem-se:

$$\left[\frac{\partial \ln k}{\partial P} \right]_T = \frac{[\bar{V}_M^\infty - \bar{V}_s^\infty]}{RT} - \left[\frac{\partial \ln \rho_M}{\partial P} \right]_T + \left[\frac{\partial \ln \rho_s}{\partial P} \right]_T + \left[\frac{\partial \ln(V_{TS} - V_{TM})}{\partial P} \right]_T \quad (23)$$

onde \bar{V}_M^∞ e \bar{V}_s^∞ são os volumes parciais molares do soluto nas fases móvel e sólida à diluição infinita e ρ_M e ρ_s são as densidades molares das fases móvel e sólida, nessa ordem.

Para uma fase estacionária incompressível, podemos reduzir a equação anterior à Equação (24):

$$\left[\frac{\partial \ln k}{\partial P} \right]_T = \frac{[\bar{V}_M^\infty - \bar{V}_s^\infty]}{RT} - k_{cm} \quad (24)$$

Dada a solubilidade do soluto em um fluido nas proximidades do ponto crítico à diluição infinita segundo GITTERMAN & PROCOCIA (1983), tem-se, de acordo com a Equação (25):

$$\left[\frac{\partial \ln y_m}{\partial P} \right]_T = \frac{[V_{sol} - \bar{V}_m^\infty]}{RT} \quad (25)$$

onde k_{cm} é a compressibilidade isotérmica da fase móvel e V_{sol} é o volume molar do soluto sólido. Na última relação, assume-se que o volume parcial molar do soluto à diluição infinita, \bar{V}_m^∞ , é aproximadamente igual ao na solução saturada, \bar{V}_M , desde que para pequenas quantidades de soluto na fase móvel.

Substituindo-se \bar{V}_m^∞ a partir da Equação (25) na Equação (24), chega-se à equação que expressa a relação com a solubilidade do soluto na fase móvel com a variação da pressão, à temperatura constante, demonstrada pela Equação (26).

$$\left[\frac{\partial \ln k}{\partial P} \right]_T = \frac{[V_{sol} - \bar{V}_s^\infty]}{RT} - \left[\frac{\partial \ln y_M}{\partial P} \right]_T - k_{cm} \quad (26)$$

YONKER & SMITH (1988) detectaram três casos, onde \bar{V}_s^∞ é igual, menor ou maior que V_{sol} . Quando iguais, não há interações intermoleculares entre a fase estacionária e o soluto e quando diferentes ($\bar{V}_s^\infty > V_{sol}$ ou $\bar{V}_s^\infty < V_{sol}$), há partição do soluto entre as fases móvel e estacionária (ou sólida).

Considerando que a constante de Henry reflete a distribuição do soluto entre as fases móvel e estacionária adicionada dos efeitos da não-idealidade da fase fluida, se conhecido o fator de retenção (k), pode ser representada como segue:

$$He = \left(\frac{\varepsilon}{1 - \varepsilon} \right) k \quad (27)$$

onde ε é a porosidade do leito.

Segundo WENDA & RAJENDRAN (2009), o poder solvente de um fluido nas proximidades do ponto crítico é função da temperatura e da pressão dado que à temperatura constante, ele aumenta proporcionalmente ao aumento da pressão. Dessa forma, a partição do soluto entre as fases móvel e estacionária descrita pela constante de Henry, é uma forte função da densidade do solvente, que quanto mais alta propicia menores valores de He .

Como a adição de um modificador polar ainda ocasiona dois tipos de impacto na separação, alteração do poder solvente da fase móvel e competição com o soluto pelos sítios de adsorção, que influenciam diretamente He do soluto, então, tanto a pressão quanto a concentração de modificador podem ser usados efetivamente para melhorar o desempenho do processo de enantioseparação.

A quantificação da influência da pressão e da concentração de modificador nas constantes de Henry que reflete diretamente na retenção do soluto torna necessário o uso de correlações semi-empíricas como ferramentas para tanto.

DI GIOVANNI *et al.* derivaram em 2001 uma relação empírica para a adsorção do fluido presente na fase fluida composto por CO₂ supercrítico e um modificador polar. Utilizando tal relação, as equações de projeto para a operação de uma unidade de LMS com fluido nas proximidades do ponto crítico sob gradiente de pressão e trabalhando no modo isocrático foram derivadas. Da mesma forma, RAJENDRAN *et al.* (2005b) adotou uma estratégia similar, tal como é descrito a seguir. Quando a concentração do soluto é baixa, o equilíbrio de adsorção pode ser descrito por uma relação linear de acordo com a Equação (28):

$$n_i = He_i C_i \quad (28)$$

onde n_i e C_i são, respectivamente as concentrações do soluto i no adsorvente e na fase fluida, em unidades de massa.

A uma dada temperatura, a relação entre a constante de Henry e a densidade da fase fluida pode ser descrita segundo a Equação (29):

$$He_i = He_i^0 \left(\frac{\rho^0}{\rho} \right)^{b_i} \quad (29)$$

onde He_i e He_i^0 são as constantes de Henry relacionadas às densidades na condição de operação e na condição de referência. Os valores de densidade em cada condição de operação podem ser obtidos usando uma equação de estado do tipo Peng-Robinson. O expoente empírico b_i é uma função do volume molar do soluto na fase fluida, à diluição infinita (RAJENDRAN *et al.*, 2005b). A Equação (24) deriva teoricamente de estudos de van WASEN & SCHNEIDER (1975) e PERRUT (1994) para sistemas diluídos e tem se mostrado precisa na representação de sistemas cromatográficos com fluido nas proximidades do ponto crítico.

A presença de solventes modificadores na fase fluida pode afetar o equilíbrio de adsorção tanto através da sua influência na densidade da fase fluida, como também através da sua influência na intensidade das forças provocadas pela superfície do adsorvente. O efeito da concentração do solvente polar adicionado à fase fluida na superfície do sólido tem sido descrito através da seguinte relação linear, descrita pela Equação (30) (RAJENDRAN *et al.*, 2005b) e foi chamada de modelo 1:

$$He_i = \frac{1}{a_i C_m + d_i} \quad (30)$$

onde C_m é a concentração do modificador (%), enquanto a_i e d_i são constantes empíricas. Ambos os efeitos apontados neste trabalho podem ser correlacionados à constante de Henry combinando as Equações (29) e (30), obtendo-se então a Equação (31), chamada de Modelo 2:

$$He_i(C_m, P) = \frac{1}{a_i C_m + d_i} \left(\frac{\rho^0}{\rho(C_m, P)} \right)^{b^*} \quad (31)$$

O expoente empírico b^* pode depender linearmente da concentração de modificador (RAJENDRAN *et al.*, 2005b) e assim, a Equação (32) pode ser reescrita da seguinte forma:

$$He_i(C_m, P) = \frac{1}{a_i C_m + d_i} \left(\frac{\rho^0}{\rho(C_m, P)} \right)^{(p_i C_m + q_i)} \quad (32)$$

2.4.3. Condições de sobrecarga

O estudo do equilíbrio de fase é a parte da termodinâmica que se preocupa com a composição de equilíbrio de duas ou mais fases assim como a influência da temperatura e da pressão nesta composição. A isoterma de adsorção é a informação mais importante para modelar processos de separação em cromatografia líquida e é dada pela relação funcional que representa a distribuição de solutos entre as fases líquida e sólida no equilíbrio à temperatura constante (SCHMIDT-TRAUB, 2005).

Sob condições de sobrecarga, as isotermas de adsorção não são lineares e esse desvio da linearidade deve-se a várias razões, principalmente relacionados à saturação e/ou à heterogeneidade da superfície ou às interações adsorbato-adsorbato na fase líquida e/ou próximo à superfície do adsorvente (JAMES *et al.*, 1999).

Em cromatografia linear, efeitos de dispersão axial e os processos de transferência de massa são os principais responsáveis pelo grande alargamento dos picos cromatográficos (MIYABE & GUIOCHON, 1999). Em cromatografia preparativa, efeitos de transferência de massa e dispersão geralmente são menos importantes e é instrutivo negligenciá-los completamente, pois isto conduz ao modelo de cromatografia de equilíbrio clássico ou ideal o que permite mais diretamente o estudo dos efeitos das funções de equilíbrio. Dessa forma, a base para vários métodos experimentais capazes de medir isotermas de adsorção é fornecida (SEIDEL-MORGENSTERN, 2004).

Assim, o conhecimento do comportamento da isoterma contribui para explicar o mecanismo de retenção e pode ajudar a propor estratégias para melhorar a separação, e conseqüentemente, a taxa de produção. Isso é de interesse particular para separações enantioméricas (MIHLBACHLER *et al.*, 2002).

Além disso, as condições ótimas de operação e desenvolvimento de uma separação 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 quirais, 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 *et al.* 2008, RIBEIRO *et al.*, 2008, ARNELL *et al.*, 2005, FELINGER *et al.*, 2003, ZHOU *et al.*, 2003).

Diversos métodos experimentais para a determinação de isotermas de adsorção para um único componente e para multicomponentes - isotermas competitivas - têm sido reportados na literatura (SEIDEL-MORGENSTERN, 2004). Esses métodos podem ser classificados em estáticos ou dinâmicos (GUIOCHON *et al.*, 1994; JAMES *et al.*, 1999; RUTHVEN, 1984). Os métodos estáticos para determinação de isotermas não analisam a curva concentração-tempo, apenas utilizam informações no estado de equilíbrio. Os métodos dinâmicos são baseados na análise matemática das curvas resposta que correspondem às mudanças bem definidas na alimentação da coluna cromatográfica ao longo do tempo (SEIDEL-MORGENSTERN, 2004).

Métodos dinâmicos são implementações dedicadas à cromatografia e que foram desenvolvidos durante os últimos 50 anos. Esses métodos incluem a análise frontal (AF), análise frontal por pontos característicos (AFPC), eluição por pontos característicos (EPC), métodos de perturbação (MP) e método inverso (MInv) (JAMES *et al.*, 1999). Os mais convencionais são AF, AFPC e EPC. Na análise frontal (AF) a coluna é alimentada pela solução da substância estudada de concentração conhecida até completa saturação. Ao atingir o equilíbrio, uma nova solução de concentração mais elevada é alimentada à coluna até que atinja um novo equilíbrio e esse procedimento é repetido gerando sucessivas curvas de ruptura (degraus sucessivos) e cada uma fornecerá um ponto na isoterma de adsorção. Já na análise frontal por pontos característicos (AFPC), a determinação da isoterma se dá a partir do perfil difusivo obtido quando há a substituição do fluxo de uma solução do soluto na fase móvel pelo de fase móvel puro, ou então o contrário (GOLSHAN-SHIRAZI & GUIOCHON, 1988). Já na eluição por pontos característicos (EPC), um grande pulso de amostra é injetado registrando-se seu perfil de eluição, sendo assim a técnica experimental mais simples. Ao contrário do AFPC, uma quantidade limitada de soluto é injetada resultando em um pico de eluição ao invés da diminuição de concentração de um platô (JACOBSON *et al.* 1984).

As principais desvantagens dos métodos estáticos são a lentidão, a incerteza para se atingir o equilíbrio e a grande quantidade de soluto e adsorvente requerida para medidas precisas (JACOBSON *et al.*, 1984). Nesse cenário, o método inverso mostra-se

como uma alternativa mais prática que foi desenvolvida nos últimos anos (ANTOS *et al.*, 2000; FELINGER *et al.*, 2003; GRITTI & GUIOCHON, 2004; ZHANG *et al.*, 2001). Este método requer apenas pequenas injeções de diferentes concentrações de amostra assim como o consumo de soluto e o tempo requerido são muito modestos. Os parâmetros da isoterma são calculados numericamente pela resolução de equações diferenciais parciais inversas e o método de regressão usado ajusta os parâmetros de adsorção da isoterma de uma maneira iterativa, até que os perfis de eluição calculados coincidam com os experimentais (FÖRSSÉN & FORNSTEDT, 2006).

O primeiro uso do método inverso para determinar uma isoterma de adsorção binária foi reportado em 1999 (JAMES *et al.*, 1999), onde o fracionamento do eluato era executado para obter os perfis individuais de eluição. Mais tarde, FELINGER *et al.* (2003) modificaram o método, tornando-o capaz de determinar isotermas de adsorção binárias de enantiômeros diretamente dos perfis de eluição, sem fracionamento. Comparações entre a análise frontal e o método inverso confirmam que isotermas monocomponentes obtidas por AF, MP e MI são muito similares entre si (CAVAZZINI *et al.*, 2002).

A determinação da isoterma pelo MI estima os parâmetros numéricos partindo da seleção de um modelo para tal isoterma. Então, perfis na faixa de sobrecarga são calculados com um modelo corretamente escolhido de cromatografia não-linear e os perfis medidos e calculados são comparados pela avaliação de uma função objetivo, tal como:

$$\min \sum_i r_i^2 = \min \sum_i (C_i^c - C_i^e)^2 \quad (33)$$

onde C_i^c e C_i^e são as concentrações calculada e experimental no ponto i e r_i é a diferença entre elas. Finalmente os parâmetros da isoterma são substituídos para minimizar essa função objetivo usando uma rotina de otimização (FELINGER *et al.*, 2003).

Caso a concentração dos solutos na fase móvel seja baixa, o equilíbrio de adsorção pode ser descrito por uma relação linear entre as concentrações nas fases estacionária e móvel, como já mostrado na Equação (28). Essa isoterma é usada normalmente na cromatografia analítica, onde fornece resultados satisfatórios. Quando se trabalha com altas concentrações, entretanto, surgem desvios da linearidade e interações competitivas entre os diferentes componentes da alimentação, havendo necessidade de modelos mais complexos descreverem o comportamento dos resultados experimentais (GUIOCHON *et al.*, 1994).

Já para altas concentrações de soluto na fase móvel, o equilíbrio de adsorção pode ser descrito por relações como as descritas por alguns dos modelos seguintes:

Modelo de Langmuir

A isoterma de Langmuir é a mais freqüentemente usada como modelo de adsorção, onde típicos efeitos de competição sob condições de sobrecarga em cromatografia não-linear podem ser ilustrados. Considera que o processo acontece em uma superfície composta de um número fixo de sítios de adsorção de igual energia, uma molécula sendo adsorvida por sítio até que a cobertura da monocamada seja atingida (SEIDEL-MORGENSTERN, 2004; JAMES *et al.*, 1999). Pela Equação (34) (SCHMIDT-TRAUB, 2005):

$$q_i = \frac{He_i C_i}{1 + \sum b_i C_i} \quad (34)$$

onde q é a quantidade adsorvida do componente i na fase sólida, He é a constante de Henry e b é o parâmetro da isoterma para dado componente i . A grande vantagem desse modelo é o pequeno número de parâmetros requeridos e a simplicidade de sua dedução. De fato, somente três parâmetros são necessários para descrever a adsorção competitiva: duas constantes de equilíbrio e a capacidade de saturação (FELINGER *et al.*, 2003).

Modelo biLangmuir competitivo

Esse modelo é uma extensão do modelo competitivo de biLangmuir quando esses dois tipos de sítios coexistem na superfície da fase estacionária. Assume que a superfície da FEQ contém dois tipos diferentes de sítios homogêneos, o não-seletivo e o enantioseletivo. Sítios não-seletivos retêm ambos enantiômeros enquanto os sítios enantioseletivos interagem diferentemente com esses dois enantiômeros, ligando-se com energias diferentes e/ou possivelmente, diferentes capacidades de saturação (FELINGER *et al.*, 2003). O modelo é descrito pela Equação (35) como:

$$q_i = q_{ns} \frac{b_{ns,i} C_i}{1 + b_{ns,i} (C_1 + C_2)} + q_s \frac{b_{s,i} C_i}{1 + b_{s,1} C_1 + b_{s,2} C_2} \quad (35)$$

em que $b_{ns,i}$ é a constante de equilíbrio do componente i para a adsorção nos sítios não-seletivos, $b_{s,i}$ é a constante de equilíbrio do componente i para a adsorção nos sítios enantiosseletivos, q_{ns} é a capacidade de saturação dos sítios não-seletivos e q_s é a capacidade de saturação dos sítios enantiosseletivos.

Modelo Langmuir competitivo modificado

Este modelo é um caso particular do modelo de Langmuir competitivo e tem se mostrado adequado para descrever a adsorção em fases estacionárias quirais (NICOUD & SEIDEL-MORGENSTERN, 1996). Na Equação (36), He é a constante de Henry, q_s é a concentração de sólido saturado e b_i é a constante de equilíbrio de Langmuir para o componente i (HAAG *et al.*, 2001):

$$q_i = HeC_i + q_s \frac{b_i C_i}{1 + b_1 C_1 + b_2 C_2} \quad (36)$$

2.5. Modos operacionais

2.5.1. Cromatografia em batelada

O uso de técnicas cromatográficas para obtenção de quantidades significativas de fármacos enantiomericamente puros é muito bem estabelecido. Separações em batelada e em sistema contínuo, como leito móvel simulado (LMS), têm se tornado nos últimos anos técnicas de rotina para separação de enantiômeros (GRILL *et al.*, 2004). A utilização de sistemas LMS requer alto investimento em capital, o que nem sempre é possível e, neste contexto, a utilização de técnicas em batelada aparece como uma alternativa satisfatória quando se deseja alcançar a separação dos enantiômeros em quantidades menores, ou seja, pequenas produtividades, suficientes para fases iniciais de desenvolvimento (KENNEDY *et al.*, 2004).

A precisão da modelagem de processos de separação em batelada requer um conjunto de equações de conservação de massa, condições iniciais e de limites apropriados que descrevam o processo exato implementado, isotermas de equilíbrio e um modelo adequado de cinética de transferência de massa. O processo cromatográfico é descrito por vários modelos de complexidade crescente, dentre os quais o modelo de equilíbrio dispersivo é o mais usado por considerar as resistências as transferências de massa pequenas, ou seja, quando a transferência de massa é controlada pela difusão na

fase móvel enquanto a troca dos eluentes entre as fases móvel e estacionária é rápida. Esse modelo assume que há um constante equilíbrio dos componentes de alimentação entre as duas fases do sistema cromatográfico e que a eficiência finita da coluna usada pode ser considerada por contribuições adicionais para a dispersão axial. Há um equilíbrio instantâneo entre a fase estacionária e a fase móvel e usa-se um termo aparente de dispersão que considera a dispersão axial e a taxa finita da cinética de transferência de massa. O balanço de massa desse modelo é descrito como mostra a Equação (37) (PEPER *et al.*, 2007):

$$\frac{\partial C_i(z,t)}{\partial t} + \left(\frac{1-\varepsilon}{\varepsilon} \right) \frac{\partial q_i(z,t)}{\partial t} + u \frac{\partial C_i(z,t)}{\partial z} + C_i \frac{\partial u(z,t)}{\partial z} = D_{ap} \frac{\partial^2 C_i(z,t)}{\partial z^2} \quad (37)$$

e as resistências à transferência de massa podem ser representadas em um único coeficiente de dispersão aparente (D_{ap}):

$$D_{ap} = \left(\frac{uL}{2N_i} \right) \quad (38)$$

onde C e q são as concentrações do componente i na fase móvel e estacionária, t é o tempo, z é a distância ao longo da coluna, ε é a porosidade da coluna, u é a velocidade intersticial da fase móvel, D_{ap} é o coeficiente aparente de dispersão axial, L é o comprimento da coluna (cm) e N o número de pratos para um componente i (SEIDEL-MORGENSTERN, 2004; FELINGER *et al.*, 2003; ZHOU *et al.*, 2003; CAVAZZINI *et al.*, 2002; GUIOCHON, 2002; GUIOCHON *et al.*, 1994).

Um sistema de equações diferenciais parciais tem sua solução a partir de um conjunto apropriado de condições iniciais e limites de contorno que descreve em termos matemáticos o experimento que é realizado. A condição inicial da coluna, em eluição, é seu equilíbrio com a corrente de fase móvel pura:

$$C_i(t = 0, 0 < z < L) = 0 \quad (39)$$

enquanto que a condição limite na entrada da coluna ($t > 0$ e $z = 0$):

$$C_i(t < t_p, z = 0) = C_{f,i} \quad (40)$$

$$C_i(t > t_p, z = 0) = 0 \quad (41)$$

com o subscrito *f* indicando um valor de entrada e t_p o tempo de injeção. Já a condição limite para a saída da coluna, $t > 0$ e $z = L$ (ZHOU *et al.*, 2003)

$$\left. \frac{\partial C_i}{\partial z} \right|_{z=L} = 0 \quad (42)$$

Para a cromatografia em batelada, o desempenho do processo pode ser avaliado através da produtividade (g/L.dia) e do consumo de eluente (L/g), como mostram as Equações (43) e (46), nessa ordem (TORIBIO *et al.*, 2006; SEIDEL-MORGENSTERN, 1998):

$$Pr odutiv = V_{inj} C_{inj} Re cup \quad (43)$$

sendo:

$$Recup = \frac{m_{recup}}{m_{inj}} * 100 \quad (44)$$

$$Pur = \frac{A_R}{A_S + A_R} * 100 \quad (45)$$

$$CSolv = \frac{Qt_{op}}{m_{recup}} \quad (46)$$

2.5.2. Leito móvel simulado

Nos últimos anos a cromatografia preparativa tem aumentado sua importância como um processo de separação e purificação nas indústrias farmacêutica, agroquímica e de alimentos, substituindo técnicas clássicas como a destilação quando estas não são possíveis (DI GIOVANNI, 2000). Cromatografia preparativa, em particular Leito Móvel Simulado (LMS), é atualmente uma das mais importantes técnicas de separação quiral na indústria farmacêutica e apresenta-se essencialmente como um separador binário particularmente apropriado para separações quirais, que permite a alimentação e separação contínua de misturas binárias (RODRIGUES & PAIS, 2004; ZHANG *et al.*, 2004).

Maior produtividade, menor custo de operação e produtos mais concentrados, são algumas das vantagens do emprego do LMS frente à cromatografia em batelada segundo SCHULTE & STRUBE (2001) e ZHANG *et al.* (2004). Economia de solvente acima de 90% e boas separações até mesmo a baixos valores de seletividade e com números de pratos relativamente baixos são outras vantagens ressaltadas por MAZZOTTI *et al.* (1997).

No início da década de 90, NEGAWA & SHOJI (1992) mostraram que benefícios significantes podem ser alcançados realizando a separação enantiomérica através da aplicação do princípio do LMS (HAAG *et al.*, 2001). A separação da mistura racêmica do 1-feniletanol foi feita utilizando Chiracel OD como fase estacionária quiral e a superioridade de LMS frente à cromatografia em batelada foi destacada no que diz respeito ao aumento da produtividade (61:1 LMS:batelada) e redução no consumo de dessorvente (1:87 LMS:batelada) (SCHULTE & STRUBE, 2001).

Recentes desenvolvimentos no campo do LMS têm destacado a possibilidade de melhorar o desempenho de separação bem como reduzir os custos de produção. O primeiro é projetar uma unidade de LMS com um número reduzido de colunas de alta eficiência assim como reduzir o custo da fase quiral (FEQ) e o segundo objetiva aumentar a eficiência da unidade de separação através da otimização da adsorvidade do soluto em diferentes seções da unidade, através da LMS com fluido nas proximidades do ponto crítico (DENET *et al.*, 2001; DI GIOVANNI *et al.*, 2001; MAZZOTTI *et al.*, 1997) LMS com gradiente de temperatura (MIGLIORINI *et al.*, 2001) e LMS com gradiente de solvente (HOUWING *et al.*, 2003; ABEL *et al.*, 2002; ANTOS & SEIDEL-MORGENSTERN, 2002; JENSEN *et al.*, 2000) ou pela operação sob condições dinâmicas mais complexas, como no caso do Varicol (PAIS & RODRIGUES, 2003; ZHANG *et al.*, 2003), PowerFeed (ZHANG *et al.*, 2004; ZHANG *et al.*, 2003) e ModiCon (SCHRAMN *et al.*, 2003).

A estrutura de um sistema de LMS consiste de uma unidade formada por um circuito de colunas cromatográficas empacotadas com um adsorvente apropriado que é dividido em quatro zonas, podendo conter duas ou mais colunas por zonas. Na tecnologia do LMS, válvulas de multiposições são utilizadas para periodicamente mudar a posição das linhas de alimentação, de extrato, e de refinado, ao longo do leito, no sentido do fluxo da fase líquida. Essas trocas são efetuadas em intervalos regulares, promovendo um movimento relativo contracorrente resultando no conceito do LMS (MAZZOTTI *et al.*, 1997; YU & CHING, 2002).

A idéia básica de um sistema com leito móvel é promover um contato contracorrente entre as fases sólida e líquidas. Entretanto, o movimento real contracorrente entre as fases sólida e líquidas não é um processo eficiente, devido à dificuldade causada pelo movimento da fase sólida. No leito móvel verdadeiro (LMV), as fases sólida e líquida escoam em direções opostas (sentido contracorrente). Sendo as afinidades de A e B para com a fase sólida diferentes ($A < B$), é possível escolher vazões para fazer A movimentar-se para cima e B movimentar-se para baixo, conduzindo a uma separação espacial, como apresentado na Figura 2.3. Este sistema requer duas linhas de entrada (uma para a alimentação e outra para o dessorvente) e duas linhas de retirada (uma para o refinado A e outra para o extrato B) (NICLOUD, 1999).

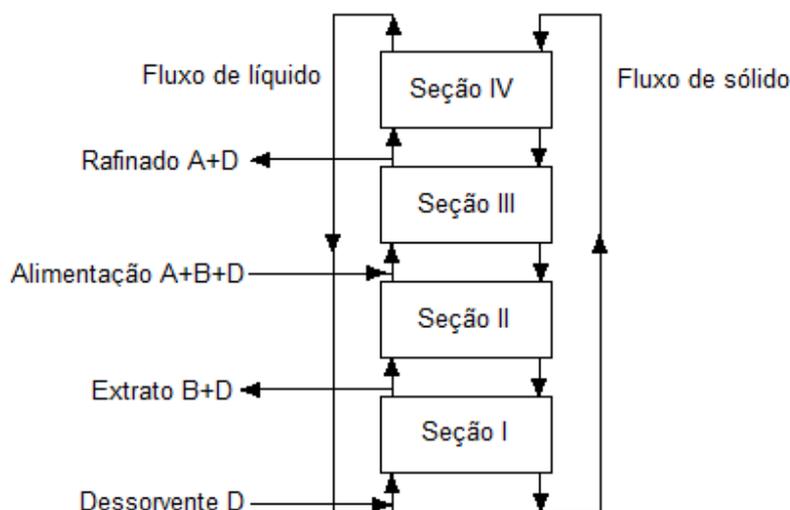


Figura 2.3. Princípio básico do LMV.

O LMV clássico (Figura 2.3) possui quatro zonas diferentes. O líquido saindo na zona IV é reciclado na zona I, enquanto que o sólido saindo na zona I é reciclado na zona IV. Em ambos os caminhos, a zona I é localizada entre a entrada de dessorvente e saída de extrato, a zona II está entre as saídas de extrato e refinado, a zona III separa a alimentação e retirada de refinado e a zona IV está localizada entre as retiradas de refinado e extrato (PAIS *et al.*, 1997). Cada zona do LMV possui um papel específico na separação (NICLOUD, 1999; MAZZOTTI *et al.*, 1997): zona I (entre a entrada de dessorvente e a saída de extrato) – o produto mais retido (B) deve ser completamente dessorvido; zona II (entre o ponto de alimentação e saída de extrato) – o produto menos retido (A) deve ser completamente dessorvido; zona III (entre o ponto de alimentação e saída do refinado) – o produto mais retido (B) deve ser completamente adsorvido e, zona

IV (entre a saída de refinado e entrada de dessorvente) – o produto menos retido (A) deve ser completamente adsorvido.

O desempenho da unidade LMS é o mesmo da LMV desde que algumas regras quanto às condições operacionais sejam obedecidas. Uma delas se refere à velocidade relativa entre o sólido e o líquido, que deve ser a mesma nos dois tipos de processo, em cada uma das zonas. Como no LMV o sólido se movimenta no sentido contrário ao do líquido, e no LMS o sólido é estacionário, é necessário que a velocidade do líquido neste último seja maior que no primeiro, para que a velocidade relativa entre sólido e líquido seja a mesma nas duas unidades (PAIS *et al.*, 1997). Outra regra de equivalência entre LMV e LMS refere-se ao movimento do sólido. Na unidade LMV, as posições das entradas (alimentação e dessorvente) e das saídas (refinado e extrato) são fixas e o sólido se movimenta. Na unidade LMS, o sólido é fixo e as posições das entradas e das saídas se movimentam. A troca de posições se dá periodicamente na direção do escoamento do líquido, simulando-se assim o movimento do sólido.

No tempo decorrido entre duas trocas de posições (t^*), o volume de sólido que se move na unidade LMS corresponde ao volume de sólido contido em uma coluna. A razão entre este volume de sólido e o tempo t^* deve ser igual à vazão real de sólido que existe na unidade LMV:

$$Q_s = \frac{V(1-\varepsilon)}{t^*} \quad (47)$$

onde V é o volume da coluna (mL).

As Equações (47) e (48) são as relações de equivalência entre as unidades LMV e LMS que devem ser obedecidas no projeto das condições operacionais do LMS (RAJENDRAN *et al.*, 2009).

$$Q_{jLMS} = Q_{jLMV} + \frac{\varepsilon}{(1-\varepsilon)} Q_s \quad (48)$$

O projeto de uma unidade LMS, no entanto, requer a escolha de condições operacionais (tempo de troca e vazões em cada seção da unidade) e diferentes metodologias para determinação destes parâmetros de projeto têm sido relatadas, dentre as quais podemos destacar o método do triângulo baseado na teoria do equilíbrio (STORTI *et al.*, 1993). O método do triângulo é aplicado tanto para sistemas que

apresentam isotermas de adsorção lineares, quanto para sistemas descritos por modelos de Langmuir estequiométrico ou não estequiométrico, onde a mistura axial e as resistências à transferência de massa são negligenciadas e o equilíbrio de adsorção é suposto em todos os locais durante todo o tempo na coluna. A teoria do equilíbrio é uma estratégia de projeto das condições operacionais do LMS que recorre a equivalência entre o mesmo e o processo LMV. Então, aplica-se um balanço material simplificado para cada componente i em uma dada seção j da unidade LMV e assim, através das equações de equivalência, é possível entender as conclusões geradas para a unidade LMS.

Seguem as simplificações assumidas pela Teoria do Equilíbrio (RHEE *et al.*, 1989):

- a vazão volumétrica de cada fase e a porosidade da fase sólida são constantes;
- o efeito da dispersão axial e da resistência a transferência de massa são desprezíveis;
- o equilíbrio termodinâmico é atingido em todos os pontos da coluna, em todos os instantes;
- o processo de adsorção é isotérmico.

Dentre os modelos comumente utilizados para representar processos cromatográficos, o da teoria do equilíbrio corresponde ao modelo dito ideal de acordo com a segunda e terceira simplificações descritas acima (GUIOCHON, 2002).

Para compreender o método e necessária a definição do parâmetro $f_{i,j}$ que corresponde a diferença entre o fluxo mássico efetivo de um dado componente i com o líquido $(n_i)_j^L$ e o fluxo mássico efetivo do mesmo com o sólido adsorvente $(n_i)_j^S$, em uma dada seção j da unidade LMV:

$$f_{i,j} = (n_i)_j^L - (n_i)_j^S \quad (49)$$

A terceira simplificação da teoria do equilíbrio considera que a concentração de cada componente i na fase líquida em uma dada seção j , e sempre a mesma c_{ij} , independente da localização. Para a fase sólida, a consideração é a mesma, na qual a concentração de i e dada por $(n_i)_j$ independente da localização. Ainda considera-se que as duas concentrações se encontram em equilíbrio termodinâmico, sendo assim relacionadas através da isoterma de equilíbrio. Dessa forma, o parâmetro $f_{i,j}$ pode ser escrito como mostra a Equação (50):

$$f_{i,j} = c_{ij}(Q_L)_{ef} - (n_i)_j(Q_S)_{ef} \quad (50)$$

onde $(Q_L)_{ef}$ e $(Q_S)_{ef}$ são as vazões efetivas de líquido e de sólido na seção j da unidade LMV.

A definição de uma vazão efetiva para o líquido leva em conta que uma fração do mesmo se encontra no interior dos poros do adsorvente, sendo transportada pelas partículas e dessa forma, na seção j tem-se:

$$(Q_L)_{ef} = Q_j - Q_S \varepsilon_p \quad (51)$$

onde ε_p a porosidade da partícula. Já a definição de uma vazão efetiva $(Q_S)_{ef}$ para o sólido leva em conta a sua porosidade, descontando o número de vazios dentro do mesmo:

$$(Q_S)_{ef} = Q_S(1 - \varepsilon_p) \quad (52)$$

Substituindo-se as Equações (51) e (52) na Equação (50), tem-se então:

$$f_{i,j} = c_{ij}(Q_j - Q_S \varepsilon_p) - n_{ij}[Q_S(1 - \varepsilon_p)] \quad (53)$$

Definindo-se o parâmetro m_j como a razão entre as vazões efetivas de líquido e de sólido na seção j da unidade LMV, tem-se:

$$m_j = \frac{Q_j - Q_S \varepsilon_p}{Q_S(1 - \varepsilon_p)} \quad (54)$$

e combinando-se as Equações (53) e (54):

$$f_{i,j} = Q_S(1 - \varepsilon_p)[c_{ij}m_j - (n_i)_j] \quad (55)$$

Então, se $f_{i,j}$ for maior que zero, na seção j o componente i terá um deslocamento para cima acompanhando o líquido e o contrário, se $f_{i,j}$ for menor que zero, seu deslocamento é para baixo acompanhando o sólido.

Como $Q_S > 0$ e $(1 - \varepsilon_p) > 0$ e a análise do sinal de $f_{i,j}$ se restringe a análise do sinal do termo entre colchetes, para que i se desloque para cima, tem-se a relação expressa pela Equação (56) e para baixo, a Equação (57):

$$f_{i,j} > 0 \rightarrow [c_{ij}m_j - (n_i)_j] > 0 \rightarrow m_j > \frac{(n_i)_j}{c_{ij}} \quad (56)$$

$$f_{i,j} < 0 \rightarrow [c_{ij}m_j - (n_i)_j] < 0 \rightarrow m_j < \frac{(n_i)_j}{c_{ij}} \quad (57)$$

De acordo com a Figura 2.3, em função do papel que cada uma das seções da unidade deve exercer na separação, pode-se dizer, para cada componente da seção, qual deve ser a direção que o mesmo deve tomar.

Seção 1:

É a única da unidade na qual o componente mais adsorvido A deve subir com o líquido para ser extraído na corrente do extrato, entre as seções 1 e 2 e também para que ocorra a regeneração do adsorvente que é reciclado para o topo da seção 4. O componente menos adsorvido B em principio deve estar presente em pequena quantidade nesta seção para não poluir a corrente de extrato, devendo ser arrastado pelo sólido na seção 4. Então, aplica-se para o componente A:

$$m_1 > \frac{n_{A1}}{c_{A1}} \quad (58)$$

Seção 2:

O componente A deve descer como o sólido rumo a seção 1 onde é desadsorvido para sair na corrente do extrato e o componente B deve subir com o líquido rumo a saída do refinado, entre as seções 3 e 4. Tem-se então:

$$\frac{n_{B2}}{c_{B2}} < m_2 < \frac{n_{A2}}{c_{A2}} \quad (59)$$

Seção 3:

O componente A deve descer com o sólido sendo adsorvido a partir do ponto de injeção da alimentação, entre as seções 2 e 3, enquanto o componente B deve subir com o líquido para ser retirado na corrente do refinado, entre as seções 3 e 4. Como as exigências quanto a direção que os componentes A e B devem tomar são idênticas as da seção 2, têm-se:

$$\frac{n_{B3}}{c_{B3}} < m_3 < \frac{n_{A3}}{c_{A3}} \quad (60)$$

Seção 4:

É a única da unidade na qual o componente menos adsorvido B deve descer com o sólido para que ocorra a regeneração do dessorvente que é reciclado para a base da seção 1. O componente A também deve descer com o sólido e dessa forma, tem-se:

$$m_4 < \frac{n_{B4}}{c_{B4}} \quad (61)$$

$$m_4 < \frac{n_{A4}}{c_{A4}} \quad (62)$$

Essa segunda relação pode ser omitida visto que se a primeira inequação for atendida esta também será pois B é mais fracamente adsorvido que A.

Todas as condições acima foram desenvolvidas para a unidade LMV mas desde que as regras de equivalência definidas anteriormente pelas Equações (47) e (48) sejam seguidas, são válidas também para a unidade LMS.

A teoria do equilíbrio considera que as concentrações c_{ij} e $(n_i)_j$ são concentrações em equilíbrio termodinâmico, seguindo portanto a equação da isoterma de equilíbrio. Se a adsorção seguir a Lei de Henry, ou seja, se a isoterma for linear, válida para uma mistura de alimentação infinitamente diluída, as restrições para o parâmetro m_j da unidade de SMB se reduz ao seguinte conjunto de desigualdades:

$$m_1 > H_A \quad (63)$$

$$H_B < m_2 < H_A \quad (64)$$

$$H_B < m_3 < H_A \quad (65)$$

$$m_4 < H_B \quad (66)$$

Essas são as limitações clássicas para a separação em LMS sob condições lineares (CHARTON & NICLOUD, 1995; RUTHVEN & CHING, 1989).

Combinando-se as equações de equivalência com a Equação (54), que define o parâmetro m_j , obtém-se para a unidade LMS:

$$m_j = \frac{Q_{jLMS} t^* - V \varepsilon_T}{V(1 - \varepsilon_T)} \quad (67)$$

onde t^* é o tempo de troca das posições das correntes da unidade LMS (min) e ε_T a porosidade total do leito.

As condições anteriores definem uma região no espaço de quatro dimensões cujas coordenadas são os parâmetros m_1 , m_2 , m_3 e m_4 cujos pontos representam condições operacionais correspondentes a completa separação dos componentes A e B. Isso significa que na corrente de refinado só deve encontrar dessorvente + B e na de extrato dessorvente + A, correspondendo a 100% de pureza em cada corrente.

Considerando-se as seções 2 e 3 da unidade LMV cujos papéis são fundamentais na separação, pode-se ver através da Figura 5 que se a alimentação injetada entre essas duas zonas se movimentar para cima, rumo a zona 3, então $m_3 > m_2$ permitindo que as condições (55) e (56) sejam agrupadas:

$$H_B < m_2 < m_3 < H_A \quad (68)$$

Essas condições definem a projeção da região completa de separação contida em um espaço de quatro dimensões sobre o plano (m_2, m_3) . A Figura 2.4 mostra um exemplo desse diagrama, o gráfico do triângulo, para um sistema descrito por uma isoterma linear.

Então, com base na teoria do equilíbrio e considerando a isoterma linear, se as vazões m_1 e m_4 satisfazem as restrições (63) a (66), pode-se prever o desempenho da unidade LMS com base na posição que o ponto determinado pelas condições operacionais ocupa no plano (m_2, m_3) .

O conhecimento balanço de massa para cada componente em cada um dos nós de ligação do LMS é de fundamental importância. Todas as vazões internas estão relacionadas com as vazões de entrada e de saída nas unidades por meio de balanço de massa em cada nó nas quais Q_1 , Q_2 , Q_3 e Q_4 são as vazões volumétricas nas correspondentes zonas do LMS, Q_F é a vazão de alimentação, Q_D é a vazão do dessorvente, Q_E é a vazão do extrato e Q_R é a vazão de refinado. Então, de acordo com as Equações (69), (70), (71) e (72) (SANTANA *et al.*, 2005):

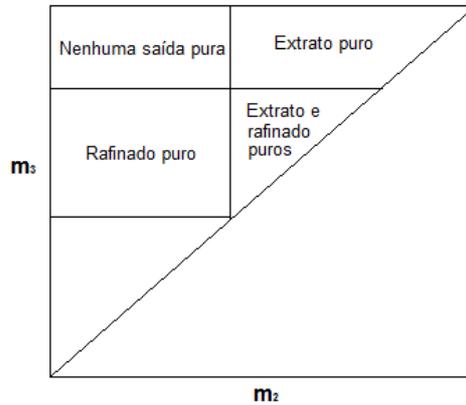


Figura 2.4. Regiões do plano (m_2, m_3) com diferentes regimes de separação em termos da pureza das correntes de saída, para um sistema descrito pela isoterma linear.

Entrada da alimentação:

$$Q_F = Q_3 - Q_2 \quad (69)$$

Entrada do dessorvente:

$$Q_D = Q_1 - Q_4 \quad (70)$$

Saída do extrato:

$$Q_E = Q_1 - Q_2 \quad (71)$$

Saída do refinado:

$$Q_R = Q_3 - Q_4 \quad (72)$$

O desempenho do processo de enantioseparação deve ser avaliado determinando-se seus quatro parâmetros característicos: pureza (%), recuperação (%), consumo de solvente (L/kg) e produtividade (gh^{-1}/kg de FEQ) como mostram as Equações (73), (74), (75) e (76), respectivamente (PAIS *et al*, 1998). Nessas equações, *Conc* refere-se às concentrações (mg/mL), *Q* às vazões volumétricas (L/h), V_{ads} ao volume de adsorvente (mL) e os subíndices *E*, *R*, *A*, *B*, *F* e *T* referem-se à extrato, refinado, componente A, componente B, alimentação e total, nessa ordem.

Pureza do refinado	$Pur = \frac{Conc_A^R}{Conc_A^R + Conc_B^R} * 100$	(73a)
Pureza do extrato	$Pur = \frac{Conc_B^E}{Conc_A^E + Conc_B^E} * 100$	(73b)
Recuperação do refinado	$Recup = \frac{Conc_A^R Q_R}{Conc_A^F + Q_F} * 100$	(74a)
Recuperação do extrato	$Recup = \frac{Conc_B^E Q_E}{Conc_B^F + Q_F} * 100$	(74b)
Consumo de solvente em relação ao refinado	$CSolv = \frac{Q_S + Q_F}{Conc_A^R * Q_R}$	(75a)
Consumo de solvente em relação ao extrato	$CSolv = \frac{Q_S + Q_F}{Conc_B^E * Q_E}$	(75b)
Produtividade do refinado	$Produtiv = \frac{Q_R Conc_A^R}{V_S}$	(76a)
Produtividade do extrato	$Produtiv = \frac{Q_E Conc_B^E}{V_S}$	(76b)

2.5.3. Otimização das condições operacionais

A otimização das condições de operação do processo cromatográfico corresponde à obtenção de valores para as variáveis de decisão que atendam aos critérios especificados para as variáveis de desempenho em cada etapa do processo. Problemas de otimização são problemas de maximização ou minimização de função de uma ou mais variáveis num determinado domínio (SUCUPIRA, 2004). De forma geral, um processo de separação é otimizado em escala de bancada e em seguida as condições de operação em escalas piloto e industrial são projetadas e testadas. Esta transposição de escalas (ou *scale up*), no âmbito dos processos cromatográficos, corresponde em aumentar o volume da coluna de separação, permitindo o processamento de volumes maiores de misturas, mantendo os níveis de desempenho do processo em bancada (BARRETO Jr., 2005).

Além dos parâmetros básicos a serem estudados, como a especificação do adsorvente e do dessorvente adequados a cada caso, a otimização de um processo de separação tem necessidade da escolha correta das condições de operação. A determinação das condições de operação ótimas não se trata de uma tarefa fácil dada a complexidade da configuração física de um sistema de separação. A determinação de tais parâmetros em laboratório torna-se trabalhosa e por este motivo outras técnicas vêm sendo desenvolvidas para a determinação das condições de operação. Estas técnicas, quando bem aplicadas são de fundamental importância pela economia de custo e tempo que possibilitam, e pelos resultados que podem ser alcançados (CERUTTI, 2003; BORGES DA SILVA, 2000).

Desde que modelos matemáticos para representação adequada dos fenômenos presentes no interior de colunas cromatográficas vêm sendo usados, a otimização das condições de operação ou o *scale up* de um processo cromatográfico têm sido desenvolvido com base na avaliação dos seus indicadores de desempenho em diferentes condições de operação por meio de simulações computacionais. As condições ótimas previstas nas simulações são testadas experimentalmente em cada escala de operação, e as possíveis discordâncias entre os resultados previsto e experimental são utilizadas para avaliar a influência de variáveis negligenciadas durante o desenvolvimento do modelo matemático e a significância dos parâmetros estimados (BARRETO Jr., 2005).

A partir da década de 80, muitas investigações científicas e tecnológicas foram desenvolvidas empregando modelos matemáticos para a otimização de condições de operação. Uma metodologia para determinação dos parâmetros ótimos de operação para colunas cromatográficas de troca iônica e afinidade quando usadas para purificação protéica, foi desenvolvida por MAO *et al.* (1993), mantendo como exigências básicas a utilização da coluna e o rendimento. A avaliação destes critérios foi realizada simulando o comportamento da coluna em diferentes combinações das variáveis de operação através de um modelo matemático da coluna cromatográfica baseado na difusão nos poros das partículas e isoterma não-linear. Os resultados buscaram a relação de cada critério com as condições de operação, auxiliando assim na seleção de vazão de operação e o volume de alimentação para alcançar um dado rendimento e uma dada taxa de produção.

Para um processo existente, esta abordagem pode ser utilizada para avaliar e melhorar o seu desempenho. Para um novo processo, este procedimento poderia assistir a especificação de equipamentos associados, como bombas e tubos, por exemplo.

2.6. Planejamento de experimentos e estimação de parâmetros

Os planejamentos experimentais foram introduzidos por G. E. Box na década de 1950 e, nos últimos 20 anos, sua aplicação vem crescendo exponencialmente desde a revolução da informática e a facilidade do uso de softwares para análises estatísticas (BARROS *et al.*, 1996). Planejar experimentos significa definir condições experimentais que ofereçam o máximo de informações relevantes para a discriminação de modelos matemáticos e/ou para a estimação de parâmetros, empregando a menor quantidade possível de experimentos (BARRETO Jr., 2005).

Experimentos são normalmente concebidos e realizados de modo a estabelecer relações qualitativas e quantitativas entre as variáveis específicas estabelecidas em um problema proposto, entretanto, como podem se tornar caros e consumir um longo período de tempo, de algum modo, uma escolha otimizada deve ser feita de forma a reduzir o número de ensaios necessários à realizar uma tarefa específica (PINTO *et al.*, 1990). Assim, uma seqüência experimental adequada busca reduzir o custo e o trabalho executado para se obter uma informação e dessa forma agilizar o processo de obtenção da mesma.

Segundo KALIL *et al.* (2000), a importância do uso da técnica de planejamento experimental advém do fato desta metodologia possibilitar a análise dos efeitos sinérgicos ou antagônicos entre as variáveis, que só podem ser verificados pela determinação dos efeitos de interação entre as mesmas através de um planejamento fatorial. Quando o comportamento da medida da resposta de interesse é governada por certas leis as quais conduzem a uma relação determinante entre a resposta e o conjunto de fatores experimentais escolhidos, deve então ser possível determinar as melhores condições dos fatores para otimizar a produção desejada (KHURI & CORNELL, 1987).

Em cromatografia, sobretudo, o uso de planejamento experimental associado à análise estatística permite a quantificação dos principais parâmetros que influenciam no processo de separação (NICOLA *et al.*, 2008). No âmbito da exploração de separação quiral, WOOD *et al.* (1996) utilizaram o planejamento fatorial como ferramenta para analisar a separação dos compostos II e XI, análogos à 8-hydroxi-(di-n-propilamino)tetralina. O mesmo grupo, no ano seguinte, utilizou a mesma técnica de planejamento de experimentos para otimizar a composição da fase móvel utilizada na resolução de pares de enantiômeros de doze compostos análogos à 2-aminotetralina (WOOD *et al.*, 1997).

Dentro deste contexto, a utilização de modelos matemáticos para a representação de processos químicos, tanto em escala laboratorial quanto industrial, também se mostra muito útil e difundida no campo da engenharia química. Modelos matemáticos são compostos por equações algébricas e/ou diferenciais que relacionam as muitas variáveis do problema, permitindo a realização de previsões sobre o comportamento do processo que podem ser utilizadas para simular, analisar, projetar e otimizar o processo que o modelo representa (SCHWAAB, 2007).

A capacidade de representação de sistemas reais por modelos matemáticos fenomenológicos depende de sua capacidade de representar adequadamente os fenômenos que ocorrem no processo em questão, assim à medida que as hipóteses estabelecidas no desenvolvimento deste modelo matemático são satisfeitas, maior será a sua capacidade de predição dos fenômenos que ocorrem no processo real. Entretanto, não é possível representar todos os fenômenos que ocorrem no processo real, seja porque as bases físico-químicas não são bem estabelecidas ou porque o aumento da complexidade do modelo matemático pode inviabilizar a resolução computacional do sistema matemático, sobretudo quando há a necessidade de modelagem de interações moleculares. Então, equações constitutivas são incorporadas na estrutura do modelo matemático correspondendo as relações funcionais desenvolvidas a partir de conhecimentos empíricos, que permitem correlacionar variável de interesse e parâmetros característicos do processo. Qualquer que seja o sistema, o conhecimento destes parâmetros só é possível por meio de observações experimentais em condições adequadas e a comparação destas observações com as respostas dos modelos teóricos possíveis. Assim, a definição da relação matemática adequada e a precisão dos parâmetros influenciam fortemente a capacidade de predição do modelo matemático esta definição exige a escolha de métodos experimentais adequados e o planejamento das condições experimentais para discriminação de modelos matemáticos e para a estimação de parâmetros precisos (BARRETO Jr., 2005).

O procedimento de inferência dos parâmetros de um modelo é chamado de estimação dos parâmetros e detém-se no ajuste de valores dos parâmetros de tal forma que as previsões do modelo sejam as mais próximas possíveis dos valores medidos experimentalmente, podendo ser dividido em três etapas: a síntese da função objetivo, a minimização da função objetivo e a análise estatística dos resultados (SCHWAAB, 2007).

A função objetivo é a medida da distância entre o modelo e os dados experimentais e, admitindo-se que o modelo é perfeito e as flutuações dos erros experimentais são conhecidas e com distribuição normal, torna-se a função de densidade de probabilidade dos desvios entre o experimento que deve ser maximizada. Essa maximização é o mesmo que minimizar a função de máxima verossimilhança, como segue a Equação (77) (BARD, 1974):

$$S = (y^{\text{exp}} - y^{\text{mod}})^T V_y^{-1} (y^{\text{exp}} - y^{\text{mod}}) \quad (77)$$

onde y_{mod} e y_{exp} são vetores contendo os valores calculados a partir do modelo e os dados experimentais, nessa ordem, e V_y é a matriz de variância-covariância dos erros experimentais. A função de máxima verossimilhança pode ser simplificada a partir de algumas hipótese. A primeira considera inexistir correlações entre as medições, que de acordo com a Equação (78), torna-se:

$$S = \sum_{i=1}^{NE} \sum_{j=1}^{NY} \frac{(y_{ij}^{\text{exp}} - y_{ij}^{\text{mod}})^2}{\sigma_{ij}^2} \quad (78)$$

onde NE é o número de experimentos, NY o número de respostas em cada experimento e σ^2 é a variância dos erros experimentais, sendo a função agora definida como mínimos quadrados ponderados.

Definida a função objetivo, parte-se à minimização desta função através da busca de um conjunto de parâmetros para o qual a função atinja o menor valor possível, o que pode, a princípio, ser feita por qualquer método de otimização, já que o mínimo da função objetivo independe do método usado para encontrá-lo. Porém, fatos como o caráter não linear dos modelos, a presença de mínimos locais e a alta correlação existente entre os parâmetros do modelo tornam a minimização da função objetivo uma tarefa não trivial. Assim, a escolha adequada do método pode ser determinante para o sucesso do procedimento de estimação de parâmetros (SCHWAAB, 2007).

Parte considerável dos procedimentos propostos na literatura para análise estatística de resultados é baseada na aproximação linear dos modelos, entretanto, os modelos de engenharia são em sua maioria não-lineares e, por isso, além do fato da minimização da função objetivo não ter uma solução analítica, a análise estatística dos resultados baseada na aproximação linear dos modelos está sujeita à qualidade desta

aproximação, podendo levar a conclusões equivocadas. Por essas razões, a minimização da função objetivo deve ser realizada com auxílio de um método numérico iterativo.

Métodos heurísticos permitem encontrar soluções, que nem sempre são ótimas, mas são atingidas mais rapidamente dessa forma do que através da utilização dos primeiros, os métodos exatos ou determinísticos. Segundo SHIMIZU (1984), o método heurístico é um método usado quando várias abordagens para a solução de um problema são conhecidas, mas não existe um algoritmo para resolver o problema de modo consistente. Dessa forma, essa metodologia examina o problema e tenta aplicar cada uma das abordagens possíveis de resolução, sendo capaz de julgar, após tentativa, se o problema está próximo ou não da solução e só termina quando nenhuma outra abordagem for possível. Um algoritmo é considerado um método heurístico quando não há conhecimentos matemáticos completos sobre seu comportamento. Desta forma, sem oferecer garantias, o algoritmo tem como objetivo resolver problemas complexos utilizando uma quantidade não muito grande de recursos, especialmente no que diz respeito ao consumo de tempo, para encontrar soluções de boa qualidade (SUCUPIRA, 2004).

2.7. O estado da arte da cromatografia com fluido nas proximidades do ponto crítico

JOHANNSEN (2001) desenvolveu em escala analítica processos para a separação dos enantiômeros de ibuprofeno, uma droga antiinflamatória pertencente ao grupo dos derivados do ácido protônico. Para tanto, utilizou onze diferentes fases estacionárias quirais, dentre as quais *Kromasil CHI-TBB* mostrou-se a mais promissora trabalhando-se com isopropanol entre 4 e 7% em CO₂ como fase móvel, após um estudo sobre o efeito do solvente modificador na separação do racemato.

WELCH *et al.* (2004) apresentaram um caso de cromatografia quiral com fluido nas proximidades do ponto crítico como parte de uma estratégia global para síntese e purificação de um possível inibidor da protease do HIV.

YANG *et al.* (2005), propuseram a separação naproxeno, droga antiinflamatória com propriedades analgésicas e antipiréticas através de CFS utilizando igualmente a coluna quiral *Kromasil CHI-TBB*. Como fase móvel, 2-propanol foi utilizado como solvente modificador ao CO₂.

BARNHART *et al.* (2005) desenvolveram um método utilizando duas colunas quirais para separar uma mistura de compostos farmacêuticos estereoisômeros via CFS, com uma fase móvel composta de 90% de CO₂ líquido e 10% de solvente orgânico. Um estudo sobre o efeito do modificador orgânico na ordem de eluição permitiu a determinação da purificação mais eficiente de uma mistura com dois ou mais estereoisômeros.

TORIBIO *et al.* (2005) examinaram a separação de fármacos quirais utilizados no combate à úlcera, usando tanto CLAE quanto CFS e verificaram que a CFS foi mais eficiente na maioria dos casos.

CARRILHO *et al.* (2006) apontaram várias aplicações da cromatografia com fluidos nas proximidades do ponto crítico em química analítica e constataram a utilização deste método na análise de produtos nas mais diferentes áreas, tais como: alimentos, produtos naturais, pesticidas, combustíveis fósseis, polímeros e, principalmente fármacos, em que relataram ser a área de maior crescimento em aplicações dos últimos anos, motivados pela utilização de CO₂ em condições de temperatura relativamente baixas, o que viabiliza a análise de fármacos sensíveis à temperatura.

Mesmo que o maior interesse da análise farmacêutica esteja centrado nas enantioseparações, a CFS preenche convenientemente um nicho onde outros tipos de cromatografia falham (HENRY & YONKER, 2006). Apesar das aplicações envolvendo CFS ainda estarem um tanto quanto restritas à escala analítica, já há inúmeras descrições de várias aplicações em escala preparativa. RAMÍREZ *et al.* (2006) relatam a separação em escala preparativa de extrato de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.), uma planta usada em alimentos, cosméticos e na medicina tradicional, pelas suas atividades hepatoprotetora e antitumorigênica. Foram avaliadas as condições ótimas, com o intuito de isolar seletivamente os compostos responsáveis pelas atividades antioxidantes e antimicrobianas da planta. Utilizaram colunas de 25 cm de comprimento por 1 cm de diâmetro, contendo partículas de 5 µm de diâmetro. Os resultados mostraram melhores condições de separação na temperatura de 80°C, pressão de 130 bar, fluxo mássico total de 20 g/min e fase móvel composta por CO₂ e 10% de etanol como modificador.

BRUNNER & JOHANNSEN (2006) apontam o sistema cromatográfico contínuo Leito Móvel Simulado (LMS) com FS como uma alternativa bastante promissora em separações preparativas, visto que superam muitas desvantagens ora enfrentadas pela

cromatografia em batelada (separação em uma única coluna), como por exemplo: há menor consumo de solvente, produtos mais concentrados e de fácil recuperação.

PEPER *et al.* (2007) compararam sistemas cromatográficos em batelada e leito móvel simulado (LMS), ambos em escala preparativa e utilizando CO₂ supercrítico como fase móvel com 5% de 2-propanol para a separação dos enantiômeros de tocoferol, ibuprofen e outras duas misturas racêmicas não identificadas. De acordo com a otimização em termos da produtividade específica, o processo em LMS mostrou-se mais promissor, o que não significa ser o mais econômico já que se partindo para a análise de custos, o processo em batelada mostrou-se mais rentável para a faixa de produção entre 0,4 e 5 ton/ano.

Já MILLER & POTTER (2008), concluíram que a resolução de enantiômeros em escala preparativa utilizando HPLC e CFS é uma técnica poderosa para a rápida geração de enantiômeros, sobretudo na indústria farmacêutica. Ainda, ressaltaram que o uso da CFS tanto para separações em escala analítica ou preparativa tem se mostrado particularmente útil reduzindo o tempo exigido de processo cerca de duas vezes em relação ao mesmo realizado em HPLC.

Capítulo 3

Materiais e Métodos

3.1. Materiais

3.1.1. Mitotano

O mitotano (o,p'-diclorodifenildicloroetano ou o,p'-DDD), C₁₄H₁₀Cl₄, representa um fármaco da categoria dos antineoplásicos. Apresenta massa molar de 320,04 g/gmol, temperatura de fusão de 349,4 K, é pouco solúvel em água (0,1 mg/L à 25°C) sendo solúvel em solventes orgânicos como etanol, isoctano, tetracloreto de carbono. Está registrado no *Chemical Abstract Service* sob o número 53-19-0. A estrutura da molécula de mitotano apresenta um carbono quiral e, por isto, existem duas formas enantioméricas (*R* e *S*) desta substância. Cerca de 200 g da mistura racêmica do mitotano foi adquirida, produzida pela empresa *Yick-Vic Chemicals and Pharmaceuticals (Hong Kong)*.

3.1.2. Fase estacionária quiral

A coluna cromatográfica empacotada com a FEQ O,O'-bis[4-*terc*-butil-benzoil]-*N,N'*-dialil-*L*-tartardiamida covalentemente imobilizada à sílica *Kromasil* por ligações cruzadas, comercialmente conhecida como *Kromasil CHI-TBB*, foi gentilmente cedida pela *Eka Chemicals* (Suécia) e foi utilizada para os experimentos com fluido nas proximidades do ponto crítico. A coluna quiral de aço inoxidável (250 x 10 mm, semipreparativa) foi empacotada com a FEQ com tamanho de partículas de 16 µm de diâmetro. Essa fase estacionária é obtida a partir do precursor *N,N'*-dialil-*L*-tartardiamida (DATD) pela derivatização de grupos hidroxilas e posterior imobilização em sílica. A imobilização em um polímero multifuncional fornece à FEQ uma maior eficiência da coluna e uma maior capacidade de saturação (SILVA Jr. *et al.*, 2006).

A FEQ *Chiralpak AD* foi gentilmente cedida pela *Chiral Technology Europe* (França) e foi utilizada para os experimentos com fluido líquido utilizando o LMS. A coluna quiral de aço inoxidável (97,5 x 25 mm, analítica) foi empacotada com a FEQ com

tamanho de partículas de 20 µm de diâmetro. Essa fase estacionária é baseada em amilose e é preparada pelo recobrimento do polissacarídeo derivatizado na forma de carbamatos, em uma matriz de sílica gel pré-tratada e podem ser utilizadas tanto no modo normal, quanto no modo reverso de eluição ou, ainda, polar orgânico (WANG & WENSLOW, 2003; TACHIBANA & OHNISHI, 2001). Nos derivados de carbamatos, os solutos podem interagir com os grupos C=O e NH através de ligações de hidrogênio e com os grupos C=O através de interações dipolo-dipolo. Assim como em cromatografia analítica quiral, a *Chiralpak*[®] AD têm sido uma das FEQs mais utilizadas em cromatografia quiral preparativa e sua capacidade de saturação é reconhecida como um importante recurso na obtenção de elevados valores de produtividade variando desde 10 g até 1.500 g de racemato por kg de FEQ por dia (FRANCOTTE, 2001; FRANCOTTE & RICHERT, 1997).

3.1.3. Fase móvel e solventes modificadores

Para a condição supercrítica, dióxido de carbono (*Praxair Inc.*, EUA) foi utilizado como fase móvel e metanol (*J. T. Baker SOLUSORB*, EUA), etanol (*Mallinckrodt Chemicals*, México) e isopropanol (*J. T. Baker SOLUSORB*, EUA) como solventes modificadores em proporções obedecendo ao intervalo de 7 a 28% v/v. Nos procedimentos de cromatografia líquida operando em Leito Móvel Simulado, a combinação estabelecida por CARVALHO Jr. (2010) foi utilizada como fase móvel, 60% de isopropanol (*Merck KGaA*, Alemanha) e 40% de metanol (*Merck KGaA*, Alemanha).

3.1.4. Unidade de separação cromatográfica em leito fixo

Os experimentos cromatográficos com fluido nas proximidades do ponto crítico foram realizados no sistema descrito na Figura 3.1, no *Laboratório de Biosseparação da Faculdade de Engenharia Química da Universidade Estadual de Campinas*, Brasil.

A unidade de separação cromatográfica quiral opera em malha aberta, ou seja, o dessorvente tem entrada e saída. O dióxido de carbono no estado gasoso oriundo de um cilindro externo (1) passa através da tubulação inicial da planta semipreparativa através da abertura manual da válvula de bloqueio (2) prévia ao resfriador. Um banho termostático (16) anexo à planta mantém o resfriador (3) a uma temperatura média de -5°C, e a partir da passagem do dióxido de carbono por este, assume-se seu estado líquido, sendo assim bombeado (5) para a célula de mistura (6).

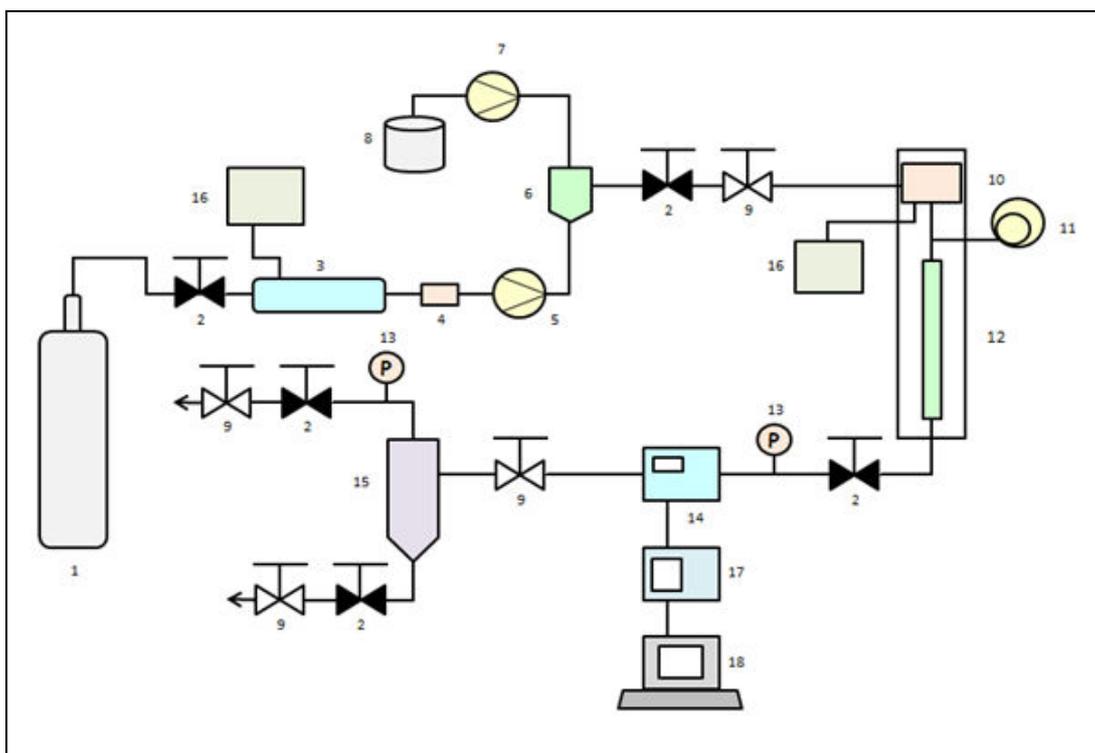


Figura 3.1. Fluxograma da unidade experimental de cromatografia com fluido nas proximidades do ponto crítico do Laboratório de Bioseparação da Faculdade de Engenharia Química da UNICAMP.

1. Cilindro de CO₂, 2. Válvula de bloqueio, 3. Resfriador da linha de CO₂; 4. Filtro, 5. Bomba de fluido, 6. Misturador estático, 7. Bomba de solvente líquido, 8. Reservatório de solvente líquido, 9. Válvula micrométrica, 10. Camisa de aquecimento da linha, 11. Válvula injetora, 12. Coluna quiral, 13. Manômetro, 14. Detector de UV, 15. Ciclone de separação, 16. Banho termostático, 17. Módulo controlador, 18. Microcomputador.

O solvente líquido, na proporção pré-estabelecida, é igual e paralelamente bombeado (7) através da tubulação para a mesma célula de mistura (6) cuja função é gerar a mistura adequada de CO₂ e solvente modificador. A mistura CO₂/solvente modificador segue pela tubulação que anterior à válvula injetora (11) é mantida à temperatura (°C) desejada para o experimento através de outro banho termostático (16) de aquecimento em um sistema de encamisamento. Dessa forma, assume-se que a mistura interior à tubulação está à mesma temperatura mantida pelo banho. Ainda, o conjunto coluna cromatográfica e camisa de isolamento da tubulação, se encontra em uma caixa acrílica pertencente à mesa que compõe o sistema cuja temperatura é igualmente controlada através do painel eletrônico. Posteriormente à válvula injetora acoplada a uma válvula multiposição que altera a posição de alimentação do loop de amostra (A) para de injeção da mesma na tubulação (B), a mistura segue para a coluna

cromatográfica quiral (12) de onde parte para o sistema de análise, detector de UV (14) conectado ao módulo de controle (17) que realiza a comunicação entre o aparelho e um microcomputador (18), onde, através do software Class-VP 5.0, os cromatogramas são gerados em função do sinal de detecção (V) e do tempo de corrida (min). A mistura segue em direção ao ciclone de separação (15), que finaliza o processo. Através da válvula micrométrica (9) anterior ao ciclone, o fluxo para proporcionar a pressão desejada para o experimento é controlado manualmente.

3.1.5. Unidade de separação cromatográfica em leito móvel simulado

Os experimentos cromatográficos em Leito Movel Simulado (LMS) com fluido líquido foram realizados no laboratório de *Physical and Chemical Foundations of Process Engineering Research Group* do *Max-Planck-Institut fur Dynamic Komplexer Technischer Systeme* em *Magdeburg*, Alemanha.

A unidade em escala analítica LMS CSEP C912[®] (Knauer, Alemanha) é representada e esquematizada nas Figuras 3.2 e 3.3. No processo, o movimento contracorrente das fases sólida e líquida é obtido mediante a substituição das colunas, graças a uma válvula de multifunção.

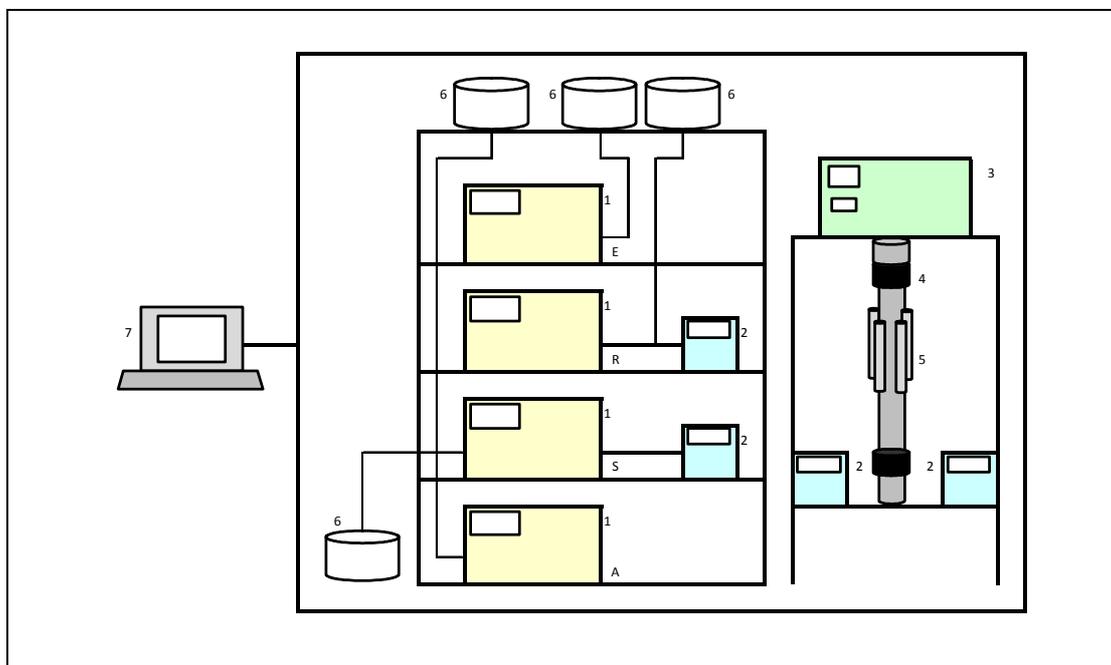


Figura 3.2. Unidade Knauer CSEP C912.

1. Bombas P1, P2, P3 e P4, 2. Detectores de UV, 3. Unidade de controle do LMS; 4. Módulo das colunas, 5. Colunas quirais, 6. Reservatórios, 7. Microcomputador.

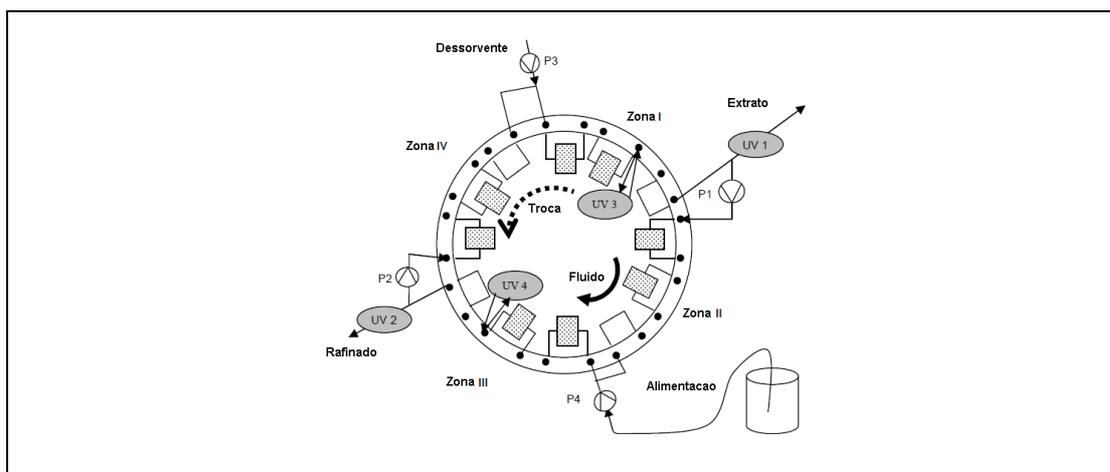


Figura 3.3. Representação esquemática da unidade Knauer CSEP C912.

Fonte: Adaptado de GROSFILS, 2009.

Esta válvula consiste de um rotor e um estator com 24 portas cada. As portas estão ligadas umas as outras por canais contínuos. Assim, todos os dispositivos internos ao círculo movem-se durante a troca enquanto o restante se mantém fixo. A planta foi construída para até doze colunas, mas apenas quatro colunas serão introduzidas no processo. Assim, as portas livres são ligadas por capilares curtos e a válvula troca alternadamente uma e duas vezes consecutivas durante um ciclo completo que é igual a 4 períodos de troca. O sistema está equipado com duas bombas de entrada, uma para a alimentação (P4), e outra para o eluente (P3). Duas outras bombas estão localizadas na linha de circulação (P1 e P2). Além disso, este processo LMS também está equipado com quatro detectores de UV, sendo dois na corrente de circulação (UV3 e UV4) (que se movem com as colunas) e dois na saída do produto (UV1 e UV2). A cada dois tempos de troca, amostras do extrato e da refinado foram coletadas e analisadas posteriormente em um sistema HPLC.

3.2. Métodos

3.2.1. Validação da unidade operacional com fluido nas proximidades do ponto crítico

3.2.1.1. Determinação da porosidade da coluna

Experimentos de pulsos cromatográficos com o composto 1,3,5-tercbutilbenzeno (TTBB) foram realizados para determinar a porosidade total (ϵ_T) da

coluna. O TTBB é uma molécula relativamente pequena (MM: 264,44 g/gmol) que como não é retida na FEQ, torna-se capaz de se difundir não somente através do espaço interparticular, mas também nos poros do adsorvente.

À temperatura constante e igual a 35°C, injeções de 50 µL de solução de 1 g/L de TTBB dissolvido na fase móvel 7% de etanol e 93% de CO₂ nas proximidades do ponto crítico foram feitas a diferentes vazões, 1, 2, 3, 4, e 5 mL/min. As respostas dos pulsos cromatográficos foram monitoradas pelo detector UV-VIS no comprimento de onda 270 nm, através do software Class-VP. Os experimentos foram realizados em triplicatas.

O valor da porosidade total ε_T foi determinado através da Equação (79) e com o valor da porosidade do leito ε , 0,380 (SARTOR, 2006) foi possível determinar a porosidade da partícula ε_P através da Equação (80).

$$\varepsilon_T = \frac{t_0^* Q}{V_{col}} \quad (79)$$

$$\varepsilon_T = \varepsilon + (1 - \varepsilon)\varepsilon_P \quad (80)$$

onde t_0 é o tempo de retenção do pulso de TTBB introduzido no sistema (min), Q é a vazão (mL/min) e V_{col} é o volume da coluna (cm³).

3.2.1.2. Determinação do volume morto da unidade cromatográfica

O volume morto da unidade de separação cromatográfica foi medido através da injeção de 50 µL de uma solução de 1 mg/mL de TTBB, 1,3,5-tri-terc-butilbenzeno (Sigma-Aldrich, EUA) a uma vazão de 1 mL/min, na ausência de coluna cromatográfica e corresponde a todas as tubulações e conexões do sistema de separação desde a válvula injetora até a unidade de detecção UV.

3.2.1.3. Calibração do sistema de análise

Para determinar as isotermas de adsorção não-lineares usando o método inverso, foi preciso calcular a concentração em cada ponto do perfil de eluição. Assim, foi necessário se obter uma função de calibração que estabelecesse a conversão do sinal do detector de UV para a concentração do soluto. Um método indireto, o método de deconvolução (ASNIN & GUIOCHON, 2005), foi empregado para obter a curva de calibração com base no mesmo cromatograma para o cálculo da isoterma. A

deconvolução baseia-se na inversão dos efeitos da convolução, que por sua vez é uma ferramenta matemática que relaciona os sinais de entrada e saída de um sistema. Dessa forma, uma função que correlacione os sinais obtidos através do detector de UV foi estabelecida de forma a minimizar a diferença entre as massas calculada a partir dessa mesma função e injetada no sistema cromatográfico.

3.2.2. Experimentos com soluções diluídas

3.2.2.1. Determinação da densidade

A determinação da densidade da mistura que compõe a fase móvel foi feita de acordo com a Equação (81), dado que a baixa concentração do mitotano não influencia no seu resultado.

$$\rho(P, T, X) = \frac{1}{V_M(P, T, X)} \quad (81)$$

onde V_M é o volume molar da fase móvel, como função da pressão, da temperatura e da composição do modificador.

DOBBS *et al.* 1987, ARAÚJO & MEIRELES (2000) e JHA & MADRAS, (2005) utilizaram a equação de estado de Peng-Robinson com a regra de mistura de van der Waals para a representação do equilíbrio de fases de sistemas binários e ternários. As Equações (82) a (86) representam a equação de estado de Peng-Robinson para substâncias puras:

$$P = \frac{RT}{V - b'} - \frac{a'}{V(V + b') + b'(V - b')} \quad (82)$$

$$a' = 0,457235 \frac{R^2 T_c^2}{P_c} \alpha' \quad (83)$$

$$b' = 0,077796 \frac{RT_c}{P_c} \quad (84)$$

$$\alpha' = \left[1 + m' \left(1 - \sqrt{\frac{T}{T_c}} \right) \right]^2 \quad (85)$$

$$m' = 0,37464 + 1,54226 \omega - 0,26992 \omega^2 \quad (86)$$

onde R é a constante dos gases, a' e b' são os parâmetros da equação relacionados com a força de atração intermolecular e volume das moléculas e ω é o fator acêntrico.

As regras de mistura para van der Waals foram usadas para o cálculo de a e b para misturas binárias, a partir dos valores de a (Equação 87) e b (Equação 88) para as substâncias puras e dos parâmetros binários de interação k_{ij} e l_{ij} , que foram admitidos como zero (ADRIAN *et al.*, 1998; KHALIL *et al.*, 2007):

$$a' = \sum_i \sum_j x_i x_j \sqrt{a'_i a'_j} (1 - k_{ij}) \quad (87)$$

$$b' = 1/2 \sum_i \sum_j x_i x_j (b'_i + b'_j) (1 - l_{ij}) \quad (88)$$

As densidades para cada condição experimental foram calculadas através da adaptação de uma rotina no *software MathCAD* a partir de uma implementação pré-definida por SANDLER (1999) para o cálculo das propriedades termodinâmicas de uma mistura multicomponente descrita por uma equação cúbica de estado.

3.2.2.2. Avaliação do equilíbrio de adsorção

O estudo da separação do mitotano foi realizado com injeções de pulsos de 50 μL de solução de 1 mg/mL do mitotano racêmico à 1 mL/min de fase móvel, variando-se as demais condições. As respostas das injeções foram monitoradas pelo detector UV-Vis a 270 nm.

O plano experimental corresponde a fixar inicialmente uma temperatura dentro do intervalo de 30 e 40°C e realizar um plano fatorial com três variáveis - pressão (dois níveis), tipo (três níveis) e composição de co-solvente (quatro níveis) - gerando vinte e quatro experimentos, como mostra a Tabela 3.1.

Composições muito baixas de co-solvente não foram passíveis de análise, pois comprometem a precisão da bomba de fase líquida.

Todos os ensaios foram realizados em triplicata para que se pudesse avaliar os erros para cada condição experimental em particular e não assumi-lo como constante. Para as mesmas condições experimentais, todos os ensaios foram reproduzidos com TTBB.

Parâmetros cromatográficos como fator de retenção (Equação 1), fator de separação (Equação 2), resolução (Equações 17) e número de pratos (Equação 14) foram determinados.

Tabela 3.1. Variações de pressão, tipo e composição de co-solvente para a determinação das isotermas de equilíbrio com fase móvel supercrítica à temperatura média de 35°C.

Ensaio	P (bar)	Tipo co-solvente	Composição co-solvente (%v/v)
1	80	Metanol	7
2	160	Metanol	7
3	80	Etanol	7
4	160	Etanol	7
5	80	Isopropanol	7
6	160	Isopropanol	7
7	80	Metanol	14
8	160	Metanol	14
9	80	Etanol	14
10	160	Etanol	14
11	80	Isopropanol	14
12	160	Isopropanol	14
13	80	Metanol	21
14	160	Metanol	21
15	80	Etanol	21
16	160	Etanol	21
17	80	Isopropanol	21
18	160	Isopropanol	21
19	80	Metanol	28
20	160	Metanol	28
21	80	Etanol	28
22	160	Etanol	28
23	80	Isopropanol	28
24	160	Isopropanol	28

Com base nas Equações (82) à (88), adaptadas a mesma rotina descrita anteriormente no *software MathCAD* a partir de uma implementação pré-definida por SANDLER (1999), as condições experimentais asseguraram a composição do eluente por uma fase única em relação às propriedades termodinâmicas da mistura multicomponente obtidas.

3.2.2.3. Avaliação das constantes de Henry

As constantes de Henry (*He*) para cada enantiômero foram determinadas pela Equação (27) a partir de experimentos de adsorção na FEQ em condições diluídas e a

influência das condições experimentais foram avaliadas. Correlações semi-empíricas descritas pelas Equações (30) e (31) foram utilizadas para tentar descrever a influência da densidade da fase fluida e da concentração de modificador na constante de Henry do soluto.

3.2.2.4. Avaliação dos coeficientes de dispersão axial e de transferência de massa

O coeficiente de dispersão axial (D_L) e o parâmetro de transferência de massa global (k_m) foram calculados a partir dos experimentos em condições lineares nas condições do ponto central. Com os gráficos de *HETP* em função da velocidade intersticial da fase móvel (u_0), os dados foram ajustados com base na Equação (9) e, determinando-se A , B e C (Equações 10, 11 e 12), foram determinados os coeficientes de dispersão axial, D_L e de transferência de massa, k_m .

3.2.2.5. Avaliação do comportamento termodinâmico da adsorção

Determinadas as condições prévias de co-solvente e composição e pressão mais promissoras à enantioseparação do mitotano, foram realizados experimentos para avaliar a influência da variação de temperatura no intervalo de 30 à 40°C, gerando três novos experimentos.

Os parâmetros termodinâmicos de adsorção foram determinados através do gráfico de van't Hoff de acordo com as Equações (19) e (20). A variação de entalpia, ΔH^0 , e variação de entropia, ΔS^0 foram determinados através da inclinação e interseção do gráfico $\ln k \times 1/T$ e os valores de $\Delta \Delta S^0$ e $\Delta \Delta H^0$ foram obtidos do gráfico $\ln \alpha \times 1/T$. A temperatura isoenantiosseletiva foi definida através da Equação (21).

3.2.3. Experimentos com soluções concentradas

3.2.3.1. Avaliação do equilíbrio de adsorção

O estudo de sobrecarga da coluna utilizando-se fase móvel supercrítica foi realizado com base nas condições de temperatura e pressão de trabalho idéias assim como a composição de eluente, definidas previamente para a condição diluída. Pulsos de dois níveis de volume do racêmico para a mesma concentração (Tabela 3.2) à vazão de 3 mL/min foram injetados na coluna cromatográfica. O valor máximo de concentração

injetada ao sistema foi estabelecido com base na solubilidade do mitotano racêmico em CO₂ nas proximidades do ponto crítico a partir dos estudos realizados por FAVARETO *et al.* (2010), de acordo com as condições de temperatura e pressão trabalhados. As respostas das injeções foram monitoradas pelo detector UV-Vis a 270 nm.

Com os resultados obtidos, foi possível a avaliação do efeito competitivo dos enantiômeros pelos sítios de adsorção através do ajuste a diferentes modelos de isotermas não-lineares.

A estimação dos parâmetros das isotermas foi realizada através do método inverso. As isotermas de equilíbrio foram determinadas por integração numérica de um modelo de cromatografia não-linear, nesse caso o Equilíbrio Dispersivo (Equação 37), e pela procura dos valores dos seus respectivos parâmetros de forma a minimizar a diferença entre os perfis experimental e calculado.

Tabela 3.2. Variações de volume dos pulsos de injeção (V_{inj}) e concentração de alimentação da mistura racêmica de mitotano (C_{alim}) para a determinação das isotermas de equilíbrio sob condições de sobrecarga utilizando como fase móvel fluido nas proximidades do ponto crítico.

V_{inj} (μL)	C_{alim} (g/L)
100	1
200	1

Um modelo de isoterma dentre as de Langmuir não-competitivo (Equação 89), Langmuir competitivo (Equação 90) e Langmuir competitivo com denominadores diferentes para cada enantiômero (Equações 91a e b) foi selecionado e estimativas iniciais para os parâmetros foram feitas.

$$q_i = \frac{A_i C}{1 + B_i C}, \text{ para } i = 1, 2 \quad (89)$$

$$q_i = \frac{A_i C_i}{1 + \sum_{j=1}^n B_{i,j} C_j}, \text{ para } i = 1, 2, j = 1, 2 \quad (90)$$

$$q_1 = \frac{A_i C_i}{1 + \sum_{i=1}^n B_i C_i}, \text{ para } i=1, 2 \quad (91a)$$

$$q_2 = \frac{A_j C_j}{1 + \sum_{j=1}^n B_j C_j}, \text{ para } j=1, 2 \quad (91b)$$

Então, os perfis de sobrecarga foram calculados a partir do modelo cromatográfico não-linear já pré-definido e os perfis medidos e calculados foram comparados através da avaliação da função objetivo, Equação (78).

Faixas para os parâmetros da isoterma foram estabelecidas e, através de uma técnica estocástica de otimização, como a otimização por Enxame de Partículas (*Particle Swarm Optimization - PSO*), a função objetivo foi calculada para cada parâmetro ou partícula. Se seu valor fosse melhor que o valor guardado no vetor que contém os valores calculados da função para cada partícula, seu valor seria atualizado, sendo também atualizada a melhor posição desta partícula na matriz que guarda a melhor solução de cada uma. Caso alguma partícula obtenha uma posição com o valor da função objetivo melhor do que aquele obtido pela melhor partícula na iteração anterior, o índice da melhor partícula seria atualizado (SUCUPIRA, 2004).

Os parâmetros finais foram definidos através de uma técnica de otimização, como o Quase-Newton, que busca o melhor resultado a partir da geração de sequências com boas propriedades de convergência sem ter que avaliar a matriz Jacobiana, matriz formada pelas derivadas parciais de primeira ordem de uma função vetorial, a cada iteração (MENDONÇA & LOPES, 2004).

Os modelos matemáticos de sistemas cromatográficos, como o Equilíbrio Dispersivo, correspondem a equações diferenciais parciais de segunda ordem acopladas a equações algébricas que caracterizam o equilíbrio de adsorção e as condições de contorno e iniciais. A resolução numérica de uma equação diferencial parcial (EDP) é desenvolvida substituindo as derivadas espaciais por aproximações discretas, gerando um problema de valor inicial. O sistema de equações diferenciais ordinárias (EDO) ou o sistema de equações diferenciais e algébricas (EAD) resultante é resolvido utilizando um integrador na variável tempo. Esta técnica de discretização no espaço e integração do sistema resultante é conhecida como método das linhas. As equações resultantes da

discretização espacial e as restrições algébricas são tratadas através da abordagem algébrico-diferencial, cujo código computacional *DASSL* (PETZOLD, 1989) tem sido empregado para a resolução numérica desse tipo de sistema devido a sua robustez e aplicabilidade em sistemas implícitos (VIEIRA & BISCAIA Jr., 2000).

3.2.4. Determinação das condições de operação

3.2.4.1. Processo em batelada

Discriminado o modelo de isoterma e definidos seus parâmetros, a concentração de alimentação foi avaliada como parâmetros de otimização na enantioseparação do mitotano para volumes de injeção de 100 e 200 μL . Foram definidas como funções objetivo, a maximização da produtividade (Equação 43) e a minimização do consumo de solvente (Equação 46), estabelecendo-se um problema de otimização multi-objetivo.

Desta forma, oito valores de concentração de alimentação entre 0,1 e 5 mg/mL, variando-se a pureza da fração coletada em três níveis não inferiores à 85%, foram avaliadas em razão destas funções objetivo. O valor máximo de concentração de alimentação foi estabelecido com base na solubilidade do mitotano racêmico em CO_2 supercrítico a partir dos estudos realizados por FAVARETO *et al.* (2010), de acordo com as condições de temperatura e pressão trabalhados. A mesma coluna cromatográfica utilizada experimentalmente foi mantida, *Kromasil CHI-TBB* (250 x 10 mm) e a velocidade intersticial do fluido mais adequada foi definida através da análise das curvas de van Deemter.

A otimização multi-objetivo foi obtida a partir da simulação do comportamento da coluna utilizando-se uma rotina similar à disponibilizada para a avaliação do equilíbrio de adsorção (item 3.2.3.1) e complementada por uma rotina adaptada ao *Excel* capaz de fornecer as variáveis de desempenho a partir dos critérios de pureza para cada enantiômero.

3.2.4.2. Processo em leito móvel simulado

3.2.4.2.1. Definição das fases estacionária e móvel

As combinações estabelecida por DIAS (2007), 95% de hexano e 5% de acetato de etila, quando utilizada a FEQ *Kromasil CHI-TBB* e por CARVALHO Jr. (2010), 60% de

isopropanol e 40% de metanol, quando utilizada a FEQ *Chiralpak AD*, foram testadas como fase móvel.

3.2.4.2.2. Solubilidade do mitotano no fluido líquido

Para determinação da concentração máxima de mitotano que se possa trabalhar, foi necessário determinar os limites de solubilidade da mistura racêmica no eluente utilizado. O equipamento Crystal16™ (Avantium Research and Technology, Holanda) foi empregado para as medidas e é composto por um sistema de múltiplos reatores que podem conter 16 (4 x 4) frascos de vidros padrão HPLC (11,5 mm diâmetro, 1,8 mL volume). Um método politérmico foi aplicado carregando os blocos do reator com três concentrações conhecidas de solução de mitotano racêmico para avaliação. O sistema foi aquecido até que os sólidos introduzidos no solvente fossem completamente dissolvidos (taxa de aquecimento: 0,5 K/min) e, em seguida, resfriado e todas as amostras recristalizadas à -10°C (taxa de resfriamento: -0,5 K/min). Com uma taxa de aquecimento de 0,04 K/min a solubilidade final foi determinada através de sensores de turbidez. Assim, as temperaturas de saturação avaliadas para as concentrações correspondentes foram plotadas por meio de uma curva não-linear (van't Hoff) para obter a curva de solubilidade final.

3.2.4.2.3. Porosidades das colunas

As porosidades das colunas, ϵ , foram medidas convencionalmente a partir de injeções de pulsos de 5 μ L de solução de 5,5 mg/mL de um composto não-adsorvido, TTBB neste caso, à vazão de 1 mL/min.

3.2.4.2.4. Estimação dos parâmetros de adsorção

Dadas as isotermas lineares, as constantes de Henry para cada enantiômero foram determinadas (Equação 27) a partir de injeções de pulsos de 5 μ L de solução de 6,5 mg/mL do mitotano racêmico à 1 mL/min de fase móvel.

3.2.4.2.5. Definição da região e pontos de operação

Para a definição dos pontos de operação, um software de simulação e otimização para separações utilizando LMS foi utilizado. O *SMB Guide*® *Windows*™ (Knauer, Berlin,

Alemanha) é capaz de prever a região de completa separação com base nas isotermas linear, de Langmuir ou multiLangmuir ou mesmo para os modelo de biLangmuir e multi biLangmuir, mostrando claramente os perfis de concentração interna e externa o que permite uma visão geral do processo LMS. Os dados de configuração e de alimentação do sistema foram necessários para que os demais parâmetros do processo fossem calculados. A concentração de alimentação foi de 5 mg/mL.

3.2.4.2.6. Avaliação das variáveis de desempenho

A avaliação do desempenho do LMS foi realizada através da análise da pureza, recuperação, consumo de solvente e produtividade, de acordo com as Equações (73a), (73b), (74a), (74b), (75a), (75b), (76a) e (76b).

Capítulo 4

Resultados e Discussões

4.1. Validação da unidade operacional com fluido nas proximidades do ponto crítico

4.1.1. Determinação da porosidade da coluna

A porosidade total da coluna a 35°C foi determinada através da Equação (80) alcançando um valor de 0,581. Com os valores de ε_T e ε definidos, 0,581 e 0,380, tem-se, de acordo com a Equação (79), o valor de ε_P , 0,339, calculado a partir do coeficiente angular da reta. Traçando-se um comparativo com os valores da porosidade total, 0,598 e da partícula, 0,352, obtidos por DIAS (2007) que utilizou a mesma FEQ *Kromasil CHI-TBB* na enantioseparação do mitotano, os valores determinados aqui para as mesmas porosidades, mantiveram-se dentro dos esperado.

4.1.2. Determinação do volume morto da unidade cromatográfica com fluido nas proximidades do ponto crítico

Dado o tempo de retenção (t_0) do pulso de 50 μL de TTBB, introduzido no sistema e a vazão utilizada (Q), 1 mL/min, obteve-se um valor de 12,76 mL de acordo com a relação:

$$V_{mt} = t_0 Q \quad (92)$$

volume este que corresponde a todas tubulações conexões do sistema cromatográfico, desde o injetor de amostra até o detector de UV.

4.1.3. Calibração do sistema de análise

Na calibração do sistema de análise de forma indireta a partir dos perfis obtidos nos experimentos de sobrecarga, a seguinte função matemática foi a que melhor

correlacionou o sinal do detector de UV com a concentração de mitotano (mg/mL), cuja relação entre as massas injetada e calculada é mostrada na Tabela 4.1.

$$C = 0,00094 * Sinal \quad (93)$$

Tabela 4.1. Relação entre as massas injetada e calculada (mg) de mitotano.

$m_{injetada}$ (mg)	$m_{calculada}$ (mg)
0,1	0,08
0,1	0,07
0,1	0,07
0,2	0,25
0,2	0,18
0,2	0,18

De acordo com a Tabela 4.1, houve uma variabilidade entre os valores das massas injetadas de soluto experimentalmente e previstas pelo modelo. Dado que o modelo foi o que melhor se adaptou aos dados dentre outros modelos testados, essa variação pode ter sido consequência de erro sistemático experimental ou mesmo de problemas de precipitação ao longo da linha.

4.2. Experimentos com soluções diluídas

4.2.1. Avaliação da influência da pressão e da composição da fase móvel no equilíbrio de adsorção

Na literatura científica, não há descrição da enantioseparação do mitotano racêmico usando cromatografia com fluido nas proximidades do ponto crítico, sobretudo utilizando a coluna *Kromasil CHI-TBB*, como descrito neste trabalho. A Tabela 4.2 mostra os valores dos parâmetros de separação para cada enantiômero do mitotano, assim como a resolução para o enantiômero S e a densidade para cada condição experimental. Valores de $\alpha = 1$ indicam que não houve separação. Os valores entre parênteses representam os desvios padrão em relação à triplicata. O primeiro enantiômero a ser eluído corresponde ao S-mitotano sendo o segundo e último o R-mitotano.

Considerando a natureza apolar do CO₂, modificadores polares são adicionados para aumentar a solubilidade particularmente quando solutos polares serão separados. A adição de um modificador polar provoca dois impactos distintos: o primeiro muda o poder

solvente da fase móvel e, no segundo, modificadores competem com os solutos pelos sítios ativos de adsorção (WENDA & RAJENDRAN, 2009).

Tabela 4.2. Valores da seletividade, fatores de capacidade e resolução para os enantiômeros do mitotano assim como a densidade nas condições experimentais estudadas.

Modificador	%	ρ (g/mL)	α	k_s	k_R	Rs_s
80 bar						
Metanol	7	0,60	1,05 (0,0001)	4,25 (0,03)	4,47 (0,03)	0,67 (0,0009)
	14	0,67	1 (0,001)	3,3 (0,2)	3,4 (0,2)	0,5 (0,007)
	21	0,71	1	2,66 (0,07)	-	-
	28	0,72	1	1,57 (0,009)	-	-
Etanol	7	0,82	1,06 (0,0003)	4,6 (0,05)	4,9 (0,05)	1,02 (0,003)
	14	0,90	1,08 (0,0007)	4,3 (0,02)	4,63 (0,02)	1 (0,02)
	21	0,93	1,06 (0,0008)	1,5 (0,01)	1,58 (0,01)	0,6 (0,01)
	28	0,93	1 (0,0013)	1,46 (0,02)	1,5 (0,02)	0,67 (0,007)
Isopropanol	7	1,03	1,08 (0,001)	3,65 (0,02)	3,94 (0,02)	0,94 (0,01)
	14	1,12	1,08 (0,0003)	2,5 (0,04)	2,7 (0,04)	0,88 (0,008)
	21	1,15	1,06 (0,002)	2,37 (0,04)	2,5 (0,04)	0,7 (0,02)
	28	1,15	1 (0,005)	2,3 (0,06)	2,3 (0,07)	1 (0,2)
160 bar						
Metanol	7	0,67	1,06 (0,01)	1,56 (0,01)	1,66 (0,01)	0,7 (0,1)
	14	0,71	1,47 (0,2)	0,7 (0,24)	1,04 (0,25)	1,06 (0,1)
	21	0,73	1	0,79 (0,01)	-	-
	28	0,73	1	0,72 (0,01)	-	-
Etanol	7	0,92	1,06 (0,01)	2,13 (0,07)	2,27 (0,1)	0,9 (0,2)
	14	0,96	1,05 (0,005)	1,47 (0,06)	1,54 (0,05)	0,6 (0,05)
	21	0,96	1	0,88 (0,05)	-	-
	28	0,96	1	1,02 (0,007)	-	-
Isopropanol	7	1,18	1,3 (0,04)	1,3 (0,14)	1,7 (0,13)	1 (0,1)
	14	1,20	1,07 (0,003)	1,65 (0,02)	1,8 (0,02)	0,8 (0,04)
	21	1,20	1 (0,002)	3,8 (0,04)	4 (0,03)	0,7 (0,04)
	28	1,18	1	2,68 (0,07)	-	-

Conc = 1 mg/mL, T = 35°C, V_{inj} = 50 μ L.

“-“: não houve separação e portanto não há resolução dos enantiômeros do mitotano

Assim, tanto a natureza como a concentração do modificador afetam a retenção e a seletividade em cromatografia com CO₂ a alta pressão (SUBRAMANIAN, 2007). Ainda, os experimentos com fluido nas proximidades do ponto crítico são sempre relacionados com a dependência de pressão: a alta pressão, a densidade aumenta melhorando a solubilidade e reduzindo a adsorção (LÜBBERT *et al.*, 2007).

Os fatores de retenção (k) decresceram com o aumento da pressão como consequência do aumento da densidade e do poder de solvatação da fase móvel. Esse comportamento também é descrito por TORIBIO *et al.* (2001), para a separação quiral de cetoconazol na coluna *Chiralpak AD* utilizando os mesmos co-solventes à 200 bar e 35°C.

Ainda, devido ao aumento da polaridade da fase móvel e da solubilidade do soluto, quando a concentração dos alcoóis adicionadas foram aumentadas houve uma redução nos valores de k , tal como observaram SU *et al.* (2009) na enantioseparação de um racêmico precursor da trans-paroxetina em *Daicel Chiralpak AD*, utilizando os mesmos álcoois como solventes modificadores à 15 MPa e 35°C. A análise do desvio padrão obtido entre as triplicatas experimentais para os fatores de retenção de cada um dos enantiômeros mostrou que eles não são aleatórios e sim sistemáticos, ou seja, aqueles que resultam das discrepâncias observacionais persistentes. Esse efeito sistemático que provoca erros no valor de k para o S-mitotano e atinge da mesma forma os valores de k para o R-mitotano poderia ser ocasionada por flutuações na vazão de trabalho, por exemplo.

Desde que muitas propriedades termofísicas podem ser relacionadas à retenção nos processos de separação utilizando cromatografia com fluido nas proximidades do ponto crítico, torna-se essencial uma investigação das características da retenção. Variando-se a pressão de 80 para 160 bar e mantendo-se a composição de solvente constante, ratificou-se a relação inversamente proporcional entre o fator de retenção dos enantiômeros do mitotano e a solubilidade do mesmo soluto na fase móvel, dado que o aumento da pressão refletiu da mesma forma no poder solvente dessa última, como mostrado na Equação (26).

Considerando-se os efeitos da composição da fase fluida, de acordo com o trabalho desenvolvido por ROTH (2004), a retenção do soluto é uma função das contribuições que advêm tanto dessa fase móvel (FM) quanto da fase sólida (FS).

De acordo com o mesmo trabalho, as mudanças no fator de retenção do soluto com a pressão em condição isotérmicas são função dos volumes parciais molares do soluto nas fases móvel e sólida à diluição infinita (\overline{V}_M^∞ , \overline{V}_S^∞), da compressibilidade isotérmica da fase móvel como fluido puro ($\beta_{M,T}$), da compressibilidade isotérmica da fase sólida saturada com a fase móvel fluida ($\beta_{S,T}$), do potencial químico do soluto na fase sólida à diluição infinita (μ_S^∞) e da fração mássica da fase móvel fluida na fase sólida (w_S). Essa relação pode ser expressa como mostra a Equação (94):

$$\left(\frac{\partial \ln k}{\partial P}\right)_T = \frac{[\overline{V}_M^\infty - \overline{V}_S^\infty]}{RT} - \beta_{M,T} - \frac{V_S}{V_M} \beta_{S,T} - \frac{1}{RT} \left(\frac{\partial \mu_S^\infty}{\partial w_S}\right)_{T,P} \left(\frac{\partial w_S}{\partial P}\right)_T \quad (94)$$

A compressibilidade isotérmica da fase móvel como fluido puro é uma função da densidade molar dessa fase móvel (ρ_M) como expressa a Equação (95):

$$\beta_{M,T} = \left(\frac{\partial \ln k}{\partial P} \right)_T * \left(\frac{\partial \ln \mu_M}{\partial \ln k} \right)_T \quad (95)$$

Considerando a incompressibilidade da fase sólida $\left(\frac{V_S}{V_M} \beta_{S,T} = 0 \right)$,

algebricamente tem-se a seguinte relação:

$$k(P, T = cte) = \exp \left[\frac{(\bar{V}_M^\infty - \bar{V}_S^\infty)P}{RT} - \ln \mu_M - \frac{V_S}{V_M} \beta_{S,T} - \frac{1}{RT} (\mu_S) \right] \quad (96)$$

O volume parcial molar do soluto na fase móvel (\bar{V}_M^∞) é relacionado ao volume molar do soluto sólido (V_{sol}) e à solubilidade do soluto em um fluido nas proximidades do ponto crítico à diluição infinita (y_M) segundo expressam GITTERMAN & PROCOCIA (1983) e SUNOL *et al.* (1994).

$$\bar{V}_M^\infty = V_{sol} - RT (\ln y_M) \quad (97)$$

Ainda de acordo com ROTH (2004), as mudanças no fator de retenção do soluto com a variação da composição do eluente à pressão e temperatura constantes são função do coeficiente de fugacidade do soluto na fase móvel à diluição infinita (φ_M^∞), da fração molar do co-solvente na fase móvel binária (X_M) e na fase sólida (X_S), das expansividades da mistura em relação à fase móvel (ξ_M) e em relação à fase sólida (ξ_S) e do potencial químico do soluto na fase sólida à diluição infinita (μ_S^∞). Tal relação pode ser expressa pela Equação (98):

$$\left(\frac{\partial \ln k}{\partial X_M} \right)_{T,P} = \left(\frac{\partial \ln \varphi_M^\infty}{\partial X_M} \right)_{T,P} - \xi_M - \frac{V_S}{V_M} \xi_S \left(\frac{\partial X_S}{\partial X_M} \right)_{T,P} - \frac{1}{RT} \left(\frac{\partial \mu_S^\infty}{\partial X_S} \right)_{T,P} \left(\frac{\partial X_S}{\partial X_M} \right)_{T,P} \quad (98)$$

A expansividade da mistura em relação à fase sólida torna-se nula dado que o adsorvente não se expande na presença do co-solvente $\left(\frac{V_S}{V_M} \xi_S \left(\frac{\partial X_S}{\partial X_M} \right)_{T,P} = 0 \right)$ e a expansividade da mistura em relação à fase móvel é dada pela Equação (99):

$$\xi_M = \frac{1}{\rho_M} \left(\frac{\partial \rho_M}{\partial X_M} \right)_{T,P} \quad (99)$$

Dado o devido tratamento algébrico, a Equação (98) pode ser dada pela relação expressa da seguinte forma:

$$k(\text{co-solvente}, X_M, P = \text{cte}, T = \text{cte}) = \exp \left[\ln \varphi_M^\infty - \ln \rho_M - \frac{1}{RT} \mu_S^\infty \right] \quad (100)$$

Assim, dadas as relações expressas pelas Equações (96) e (100), o fator de retenção pode ser expresso como segue:

$$k = k(P, T = \text{cte}) * k(\text{co-solvente}, X_M, P = \text{cte}, T = \text{cte}) \quad (101)$$

Da forma com que foram expressas as relações do fator de retenção com a variação de pressão e com a variação da composição da fase móvel, é visto que ambas são dependentes de características das fases móvel (FM) e sólida (FS).

A parcela que se refere à fase móvel demonstrou as influências do co-solvente e da pressão na condição termodinâmica dessa mesma fase e também contemplou propriedades como o coeficiente de fugacidade e a solubilidade que, como são idênticas para ambos os enantiômeros do mitotano, evidenciou que os efeitos da composição e da pressão no coeficiente de retenção foram idênticos para ambas as formas. A contribuição referente à fase sólida se pronunciou através das mesmas influências anteriores no estado termodinâmico dessa fase adicionada de propriedades de cada um dos enantiômeros do mitotano como o volume molar do soluto sólido e parcial molar do soluto adsorvido na superfície da FEQ, esses sim responsáveis pela discriminação quiral no processo de separação. Então, as contribuições de FM e FS podem ser sumarizadas como segue abaixo, a partir das relações expressas anteriormente a partir dos estudos realizados por ROTH (2004):

$$FM(\text{co-solvente}, X_M, T, P) = \frac{\frac{\varphi_M^\infty(\text{co-solvente}, P = \text{cte}, T, X_M)}{\rho_M(\text{co-solvente}, P = \text{cte}, T, X_M)}}{\rho_M(\text{co-solvente}, P, T, X_M = \text{cte}) y_M(\text{co-solvente}, P, T, X_M = \text{cte})} \quad (102)$$

$$FS(\text{co-solvente}, V_{sol}, \bar{V}_s^\infty, X_s, T, P) = \exp \left[\frac{(V_{sol} - \bar{V}_s^\infty(X_s = \text{cte}, P))P - \mu_s^\infty(X_s, P = \text{cte})}{RT} \right] \quad (103)$$

E assim, outra forma de expressar a relação dada pela Equação (101) segue abaixo:

$$k = FM(\text{co-solvente}, X_M, T, P) FS(\text{co-solvente}, V_{sol}, \bar{V}_s^\infty, X_s, T, P) \quad (104)$$

O efeito combinado entre a densidade da fase fluida e o coeficiente de fugacidade do mitotano nessa mesma fase fluida em função do percentual de solvente modificador adicionado ao CO₂ nas proximidades do ponto crítico à pressão fixa de 160 bar, contribui para o aumento do fator de retenção do mitotano. Já o efeito global das propriedades da fase móvel indicou que há uma redução do fator de retenção até determinado percentual de co-solvente seguido de um crescimento exponencial a partir deste mesmo ponto, como mostra a Figura 4.1.

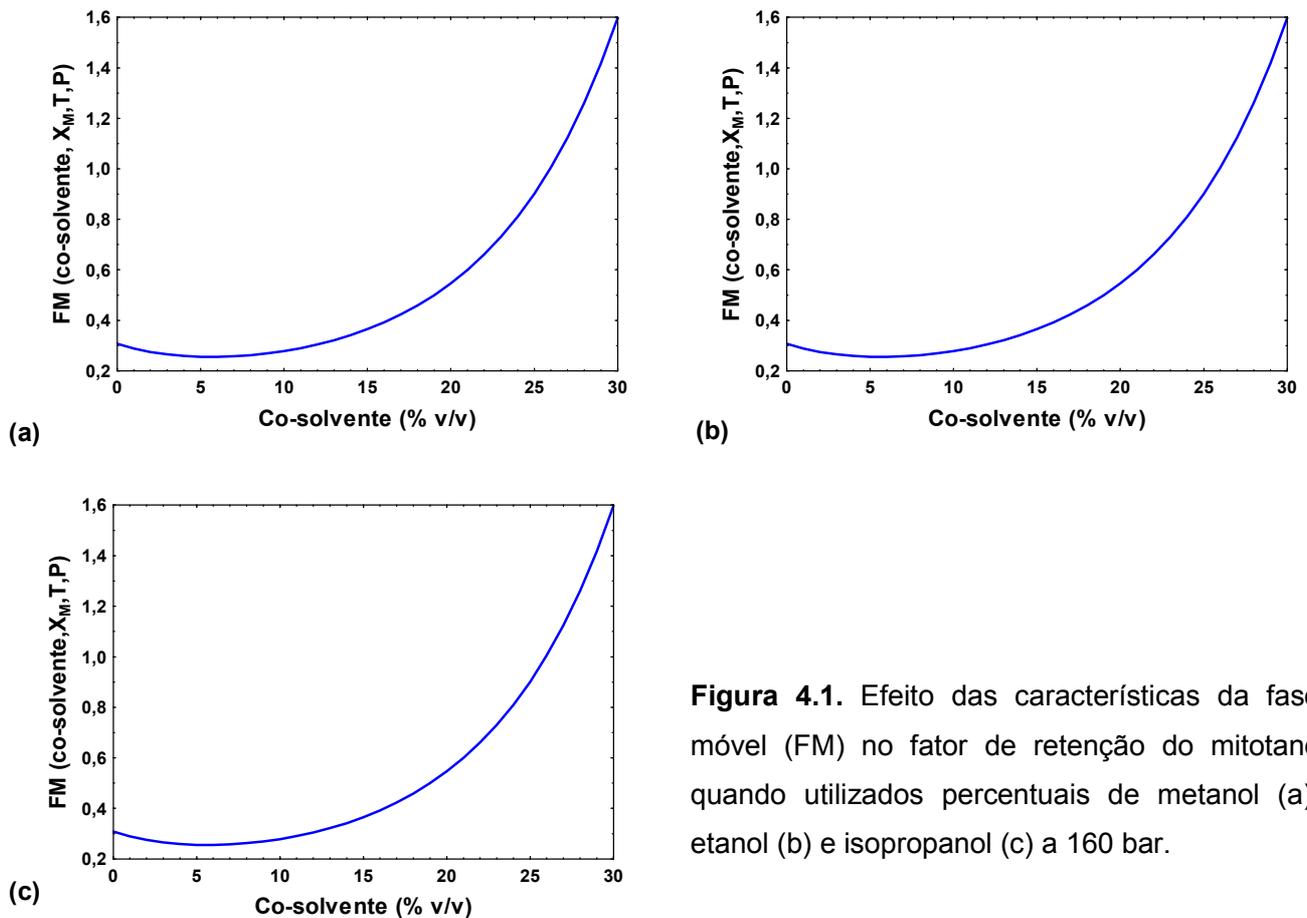


Figura 4.1. Efeito das características da fase móvel (FM) no fator de retenção do mitotano quando utilizados percentuais de metanol (a), etanol (b) e isopropanol (c) a 160 bar.

Da mesma forma, foi feita a análise do efeito global das propriedades da fase sólida no fator de retenção do mitotano. Sendo a contribuição referente à fase sólida no fator de retenção dependente do potencial químico do soluto adsorvido na superfície da fase estacionária, pode-se avaliar o quanto a retenção do soluto é influenciada por essa propriedade. Dado que a avaliação do potencial químico a partir de propriedades termodinâmicas do soluto tanto na fase móvel como na fase estacionária demandaria do uso de um modelo de energia de excesso, decidiu-se por definir o potencial químico como uma função linear do percentual de co-solvente adicionado ao CO₂ nas proximidades do ponto crítico.

A Figura 4.2 expõe o comportamento do fator de retenção do mitotano como função das propriedades da fase sólida.

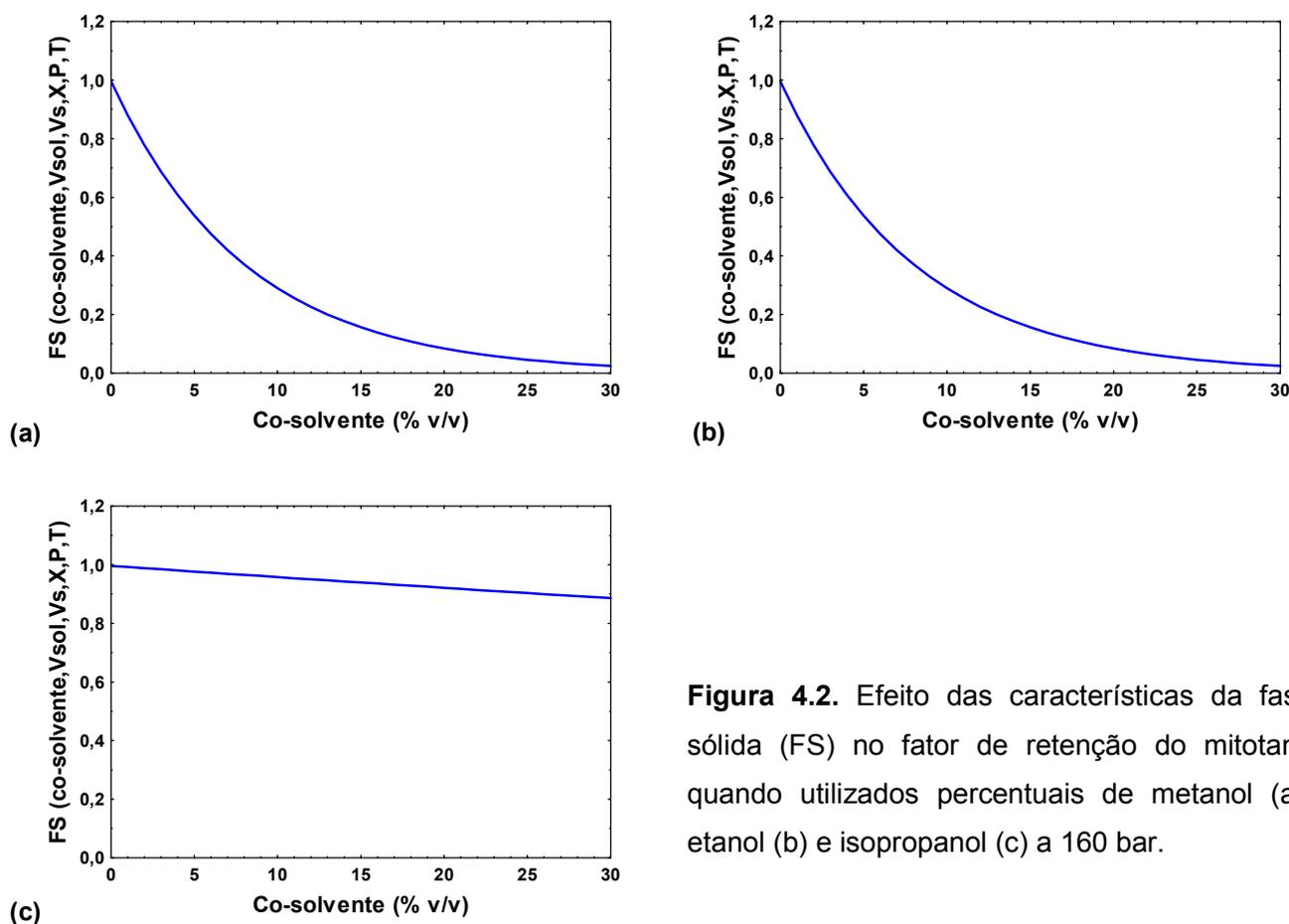


Figura 4.2. Efeito das características da fase sólida (FS) no fator de retenção do mitotano quando utilizados percentuais de metanol (a), etanol (b) e isopropanol (c) a 160 bar.

Para o metanol e o etanol, pode-se dizer que os potenciais químicos do soluto adsorvido na fase estacionária foram análogos, pois o comportamento observado foi o

mesmo: o aumento do percentual de co-solvente ocasionou um decréscimo no fator de retenção do mitotano. Dessa forma, o potencial químico do mitotano adsorvido foi diferente apenas quando adicionado isopropanol como solvente modificador no momento que o aumento da concentração de modificador ocasionou um aumento no fator de retenção do mitotano.

Quando utilizado etanol e metanol, a retenção do mitotano foi mais influenciada pelas características da fase sólida e o potencial químico do soluto adsorvido é mais dependente do percentual de co-solvente. Entretanto, utilizando-se isopropanol essa dependência foi menos pronunciada e as características da fase sólida exerceram uma baixa influência na retenção do soluto quando utilizado esse álcool.

Dessa forma, o comportamento do parâmetro k , Figura 4.3, quando adicionado cada um dos alcoóis utilizados como co-solvente foi influenciado, sobretudo, pelas contribuições provenientes da fase sólida, as quais promovem a discriminação quiral.

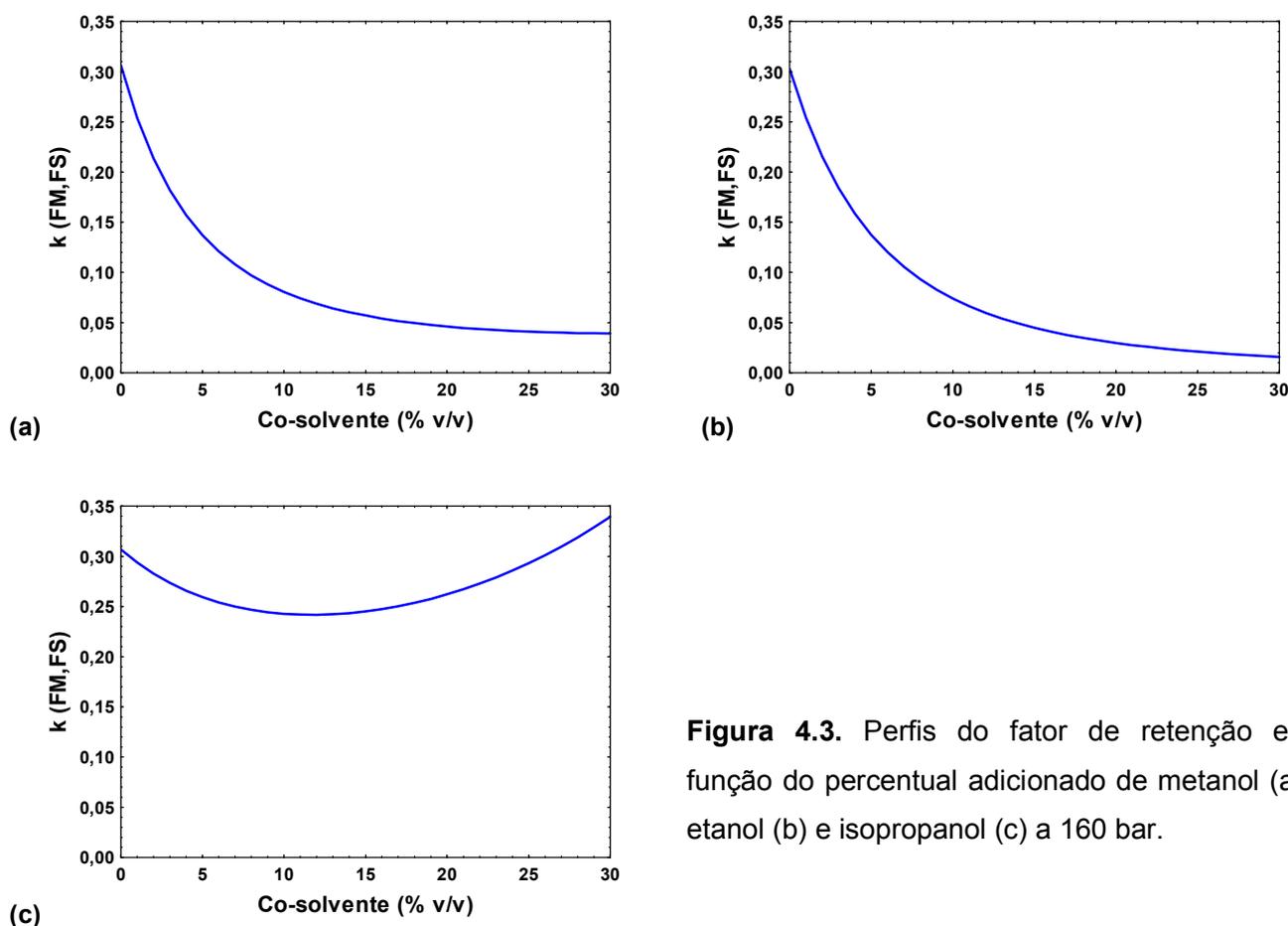


Figura 4.3. Perfis do fator de retenção em função do percentual adicionado de metanol (a), etanol (b) e isopropanol (c) a 160 bar.

A seletividade (α) é dada pela relação entre o fator de retenção (k) do componente mais retido pelo do componente menos retido que é somente função da distribuição do soluto entre as fases móvel e estacionária. Como segundo FRANCOTTE & JUKER-BUCHHEIT (1992), a seletividade de enantiômero frente a outro é primeiro determinada pela capacidade de reconhecimento da FEQ para então ser influenciada por outros fatores, à 160 bar, para a adição de 7% de isopropanol, diferenças entre as forças de adsorção dos enantiômeros se pronunciaram durante o processo de enantioseparação e com a adição de 14% de metanol, essas diferenças tornaram-se ainda mais significativas de forma a se obter a seletividade mais promissora, com valor de 1,47.

Em torno dessa seletividade, se tem um intervalo de valores que contempla um mínimo de 0,97 e um máximo de 1,97, ou seja, entre esses está o valor plausível para o fator de separação baseado nos dados amostrais com 98% de confiança. Ainda assim, dentro dessa região as chances de que se alcance a enantioseparação do mitotano são superiores e dessa forma mais promissoras do que seriam nas demais condições experimentais, mesmo que considere os baixos valores obtidos para o desvio padrão.

Ainda de acordo com o que expõe ROTH (2004) e baseado nas relações definidas pelas Equações (102) e (103), a seletividade pode ser expressa a partir das seguintes relações:

$$\alpha = \frac{k_1(FM, FS)}{k_2(FM, FS)} = \frac{\left[\frac{\frac{\varphi_M^\infty(\text{co-solvente}, P = \text{cte}, T, X_M)}{\rho_M(\text{co-solvente}, P = \text{cte}, T, X_M)}}{\rho_M(\text{co-solvente}, P, T, X_M = \text{cte})y_M(\text{co-solvente}, P, T, X_M = \text{cte})} \exp \left[\frac{(V_{sol} - \bar{V}_S^\infty(X_S = \text{cte}, P))P - \mu_S^\infty(X_S, P = \text{cte})}{RT} \right] \right]_1}{\left[\frac{\frac{\varphi_M^\infty(\text{co-solvente}, P = \text{cte}, T, X_M)}{\rho_M(\text{co-solvente}, P = \text{cte}, T, X_M)}}{\rho_M(\text{co-solvente}, P, T, X_M = \text{cte})y_M(\text{co-solvente}, P, T, X_M = \text{cte})} \exp \left[\frac{(V_{sol} - \bar{V}_S^\infty(X_S = \text{cte}, P))P - \mu_S^\infty(X_S, P = \text{cte})}{RT} \right] \right]_2} \quad (105)$$

No momento que as contribuições relativas à FS são as que promovem a discriminação quiral, são baseadas nelas as colocações pertinentes ao comportamento da seletividade.

Para um dado percentual de co-solvente constante, a seletividade torna-se então uma função da variação da pressão que por sua vez, é diretamente influenciada pelo volume parcial molar de cada uma das espécies adsorvidas na superfície da fase sólida. Dessa forma, a variação da pressão pode tornar mais ou menos intensas as interações de

cada um dos enantiômeros com a fase sólida, o que é fundamental para a partição do soluto entre as fases. Assim comparando-se as seletividades obtidas quando adicionado 14% de metanol à 80 e 160 bar, no último caso, um dos enantiômeros interagiu com maior intensidade com a fase sólida do que o outro e como interações mais intensas ocasionam a retração do volume parcial molar do enantiômero na superfície da fase estacionária, o volume parcial molar desse enantiômero na superfície da FEQ manteve-se menor que o da outra espécie.

Contudo, considerando-se o processo de separação à pressão constante, o comportamento da seletividade tornou-se uma forte função do potencial químico do mitotano adsorvido e, dessa forma, esse mesmo potencial químico foi significativamente superior para uma das espécies quando utilizado 7% de isopropanol e ainda mais quando adicionado 14% de metanol como solvente modificador resultando nas seletividades mais altas e destacando-se dos demais casos onde o potencial químico de cada uma das espécies tende a valores similares.

As resoluções obtidas em cada condição estudada, a maioria não superior a 1,00, foram semelhantes aos valores obtidos por TORIBIO *et al.* (2004) na separação enantiomérica de hexaconazol e tebuconazol, pesticidas do grupo triazol, utilizando a coluna *Chiralpak AD* e CO₂ supercrítico como eluente com a adição de metanol, etanol e isopropanol em três concentrações diferentes, a 35°C e 200 bar e aos obtidos por BERNAL *et al.* (2000) na separação dos enantiômeros de quatro compostos derivados de 1-dioxilane a 35°C e 200 bar utilizando CO₂ supercrítico com a adição de metanol, etanol, 2-propanol ou acetonitrila como fase móvel e *Chiralpak AD*.

4.2.2. Avaliação das constantes de Henry

Na Tabela 4.3 estão expressos os valores das constantes de Henry para todas as condições experimentais estudadas e os respectivos desvios padrão em relação à triplicata experimental. Para condições onde a separação não foi alcançada, apenas um valor de *He* contempla as duas formas, S e R-mitotano.

Para a temperatura fixa estudada de 35°C e um dado percentual de modificador, os valores das constantes de Henry decresceram com o aumento da pressão já que em condições supercríticas, a partição do soluto entre a FEQ e a fase fluida é uma forte função do poder solvente da última. O incremento da pressão aumenta o poder solvente da fase fluida o que conduz a uma redução do valor de *He* do soluto. Ainda, quando a

pressão de trabalho é mantida constante, o aumento do percentual de modificador também ocasiona um decréscimo nos valores de He . Isto pode ser explicado de duas formas: na primeira, a adição de um solvente polar como o metanol, o etanol e o isopropanol, aumenta a densidade da fase fluida e conseqüentemente poder solvente, ambas tendendo à redução de He e na segunda, atribuída aos possíveis efeitos de competitividade entre o soluto e o modificador pelos sítios de adsorção, dado que o modificador pode também ter adsorvido na FEQ. Contudo, para a adição de 21 e 28% de isopropanol, o comportamento contrariou o estabelecido nos demais casos, e a constante de Henry aumentou com o aumento da pressão de 80 para 160 bar.

Os parâmetros das Equações (25) e (26) foram estimados a partir da minimização da função de mínimos quadrados entre os valores de He para cada componente calculados e os valores correspondentes obtidos a partir dos resultados experimentais.

Tabela 4.3. Valores das constantes de Henry para os enantiômeros do mitotano nas condições experimentais estudadas.

Modificador	%	ρ (g/mL)	80 bar		160 bar		He_R	
			He_S	He_R	He_S	He_R		
Metanol	7	0,60	7,1 (0,09)	7,5 (0,1)	7	0,67	2,7 (0,07)	2,9 (0,04)
	14	0,67	5,6 (0,34)	5,8 (0,35)	14	0,71	1,17 (0,4)	1,7 (0,4)
	21	0,71		4,6 (0,04)	21	0,73		1,28 (0,03)
	28	0,72		2,95 (0,03)	28	0,73		1,14 (0,006)
Etanol	7	0,82	8,7 (0,12)	9,3 (0,1)	7	0,92	2,95 (0,1)	3,1 (0,1)
	14	0,90	8,6 (0,12)	9,2 (0,1)	14	0,96	2,2 (0,04)	2,3 (0,03)
	21	0,93	3 (0,09)	3,2 (0,10)	21	0,96		1,4 (0,001)
	28	0,93	2,96 (0,01)	3,1 (0,01)	28	0,96		1,4 (0,01)
Isopropanol	7	1,03	7,4 (0,19)	7,9 (0,2)	7	1,18	2,15 (0,24)	2,8 (0,23)
	14	1,12	4,8 (0,12)	5,1 (0,1)	14	1,20	2,6 (0,03)	2,75 (0,03)
	21	1,15	4,2 (0,12)	4,4 (0,1)	21	1,20	5,3 (0,06)	5,5 (0,07)
	28	1,15		4 (0,13)	4,1 (0,1)	28	1,18	

Conc = 1 mg/mL, T = 35°C, V_{inj} = 50 μ L.

Os valores obtidos para os parâmetros de cada modelo estão apresentados na Tabela 4.4.

Adicionando-se metanol à 80 bar, assim como isopropanol à 160 bar, a influência da concentração de modificador se pronunciou na densidade da fase fluida e no parâmetro b . De acordo com a descrição anterior do parâmetro b^* , nestes dois casos houve a influência da variação do volume molar do soluto na faixa de concentração de modificador estudada, entre 7 e 28%. Ainda, as concentrações de metanol e isopropanol provocaram efeitos opostos no volume molar enquanto o etanol não modificou o volume molar do mitotano nestas condições.

Quando adicionados isopropanol a 80 bar e metanol a 160 bar, o efeito da concentração de modificador se pronunciou apenas na densidade pois b^* independe da composição de co-solvente.

Tabela 4.4. Parâmetros correspondentes às Equações (25) e (26) a 80 e 160 bar, para diferentes solventes modificadores.

Modificador	Enantiômero	a	d	b*	
				p	q
80 bar					
Metanol	S	0,12 (0,03)	-0,7 (0,2)	0,27 (0,02)	-19,5 (1,9)
Etanol	S	-	0,12 (0,002)	8,77 (0,3)	
	R	-	0,1 (0,002)	7,9 (0,3)	
Isopropanol	S	-	0,13 (0,003)	4,5 (0,4)	
	R	0,0014 (0,0004)	0,12 (0,003)	4,14 (0,4)	
160 bar					
Metanol	S	-	0,36 (0,01)	8,04 (0,75)	
	R	0,0015 (0,001)	0,34 (0,009)	8,82 (0,71)	
Isopropanol	S	-0,009 (0,001)	0,56 (0,045)	-3,9 (0,14)	50,5 (4,2)
	R	-0,003 (0,0008)	0,38 (0,02)	-4,38 (0,12)	64,3 (0,6)

Conc = 1 mg/mL, T = 35°C, V_{inj} = 50 µL.

“-“: parâmetro não significativo no modelo.

Para a adição de metanol a 80 bar, não foi possível a adaptação de nenhum dos modelos anteriores para o R-mitotano assim como para a adição de etanol a 160 bar.

Se o termo $\left(\frac{1}{a_i C_m + d_i} \right)$ reflete o efeito da concentração do solvente polar

adicionado à fase fluida na superfície do sólido, com a adição de metanol à 80 bar na faixa de composição estudada houve a influência mais pronunciada da concentração de modificador nas características da FEQ, para o enantiômero 1.

Como o termo $\left(\frac{\rho^0}{\rho}\right)$ reflete a densidade da fase fluida que por sua vez é função da composição da mesma fase e da pressão de trabalho, tais parâmetros influenciam a constante de Henry em todas as condições estudadas.

Dado que as constantes empíricas p e q têm sinais opostos, há uma indicação de que a discriminação quiral poderá ser decorrente da variação do volume molar do soluto para cada enantiômero em relação à concentração do co-solvente. Quanto maior o percentual adicionado de solvente modificador, menor o potencial de discriminação quiral e ainda que haja um incremento na solubilidade do mitotano na fase fluida, não há um aumento na seletividade.

Desta forma, as correlações semi-empíricas foram capazes de descrever a influência da densidade da fase fluida e da concentração de modificador na constante de Henry do soluto de forma satisfatória.

4.2.3. Avaliação dos coeficientes de dispersão axial e de transferência de massa

A eficiência da coluna cromatográfica foi avaliada através da análise de *HETP*, uma função do número de pratos (N) como expressa a Equação 14. Na Tabela 4.5 se tem os valores de N para as cinco vazões estudadas à temperatura constante de 35°C com adição de 18% de metanol ao CO₂ nas proximidades do ponto crítico como eluente a 120 bar, condições do ponto central do plano experimental. Entre parênteses estão os desvios padrão em relação à triplicata experimental.

Tabela 4.5. Número de pratos a diferentes vazões de trabalho medidas na coluna.

Q (mL/min)	N _S	N _R
0,39	779,1 (30,2)	911,6 (4,3)
0,78	763,75 (39,2)	902,8 (8,6)
1,16	571,45 (45,9)	784,7 (7)
1,55	541 (53)	651,9 (7)
1,94	484,8 (10,6)	589,4 (17)

Conc = 1 mg/mL, T = 35°C, FM = CO₂ + 18% metanol

P = 120 bar, V_{inj} = 50 µL.

De acordo com os resultados obtidos, foi possível observar que os valores de N diminuíram com o aumento da vazão e tal fenômeno é decorrente da forte diminuição do tempo de retenção dos enantiômeros.

A Figura 4.4 mostra a dependência de $HETP$ com a velocidade intersticial da fase móvel (u_0) através do gráfico de van Deemter, para ambos os enantiômeros do mitotano. Para baixas velocidades, $HETP$ diminuiu com o aumento da velocidade o que evidenciou que nesta condição a difusividade molecular do mitotano na fase fluida foi alta e comparável à difusividade turbilhonar. Essa representação gráfica exibe um valor mínimo de $HETP$, uma velocidade superficial ótima que foi usada como parâmetro na etapa de otimização do processo em batelada. Esse valor mínimo é resultante das contribuições de diferentes fenômenos: de transferência de massa e hidrodinâmicos e, é nesse valor de velocidade ótima que se tem a maior eficiência da coluna, associada à alta difusividade do fluido nas proximidades do ponto crítico em relação aos líquidos (WENDA *et al.*, 2011).

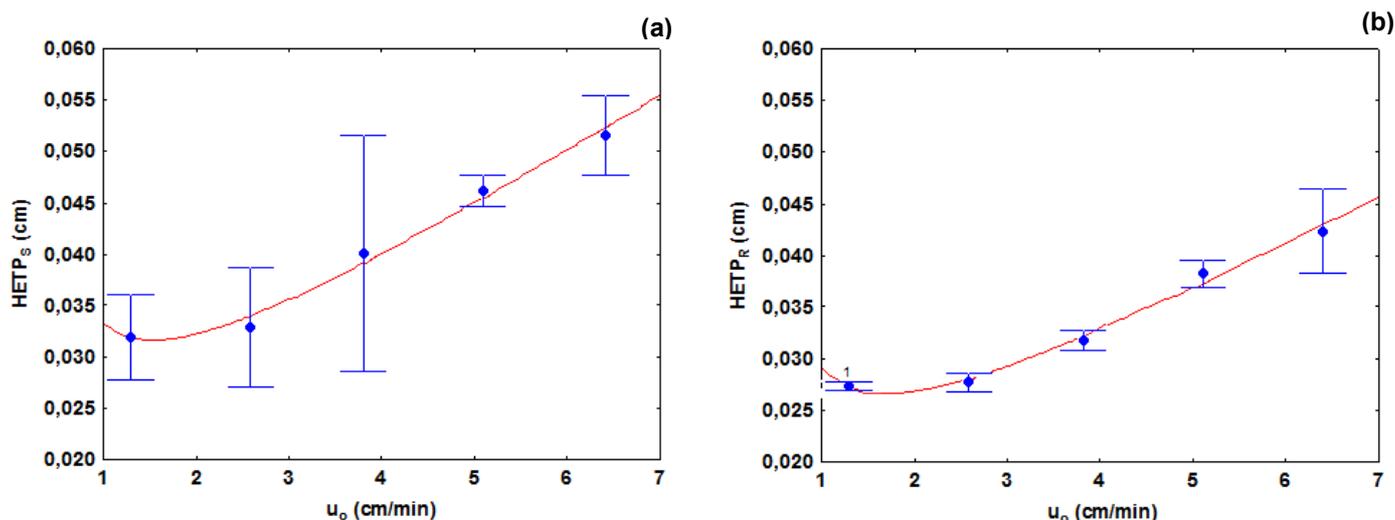


Figura 4.4. Gráfico de van Deemter para o S (a) e R-mitotano (b).

Os coeficientes lineares e angulares das retas apresentadas na Figura 4.6 representam os parâmetros A , B e C da equação de van Deemter (Equação 9), respectivamente e seus valores para os dois enantiômeros juntamente com os respectivos coeficientes de correlação estão na Tabela 4.6.

Com a determinação dos coeficientes A , B e C , foi possível calcular os valores dos coeficientes de dispersão axial (D_L) e de transferência de massa global (km), como mostra a Tabela 4.7.

Tabela 4.6. Parâmetros A , B e C da equação de van Deemter para os enantiômeros do mitotano.

Enantiômeros	A	B	C	r^2
S	$1,43 \cdot 10^{-2}$ (0,0045)	$0,56 \cdot 10^{-2}$ (0,0007)	$1,33 \cdot 10^{-2}$ (0,0055)	0,99
R	$1,02 \cdot 10^{-2}$ (0,003)	$0,478 \cdot 10^{-2}$ (0,0005)	$1,41 \cdot 10^{-2}$ (0,004)	0,99

Tabela 4.7. Coeficientes de dispersão axial e de transferência de massa global para os enantiômeros do mitotano.

Enantiômeros	D_L	km (min^{-1})
S	$2,8 \cdot 10^{-3} + 7,16 \cdot 10^{-3} u_0$	24,88 (3,5)
R	$2,4 \cdot 10^{-3} + 5,1 \cdot 10^{-3} u_0$	17,76 (1,7)

Traçando um paralelo entre os resultados obtidos em sistemas utilizando fluido nas proximidades do ponto crítico e os obtidos em sistemas de HPLC típico, foi verificada a presença de efeitos de difusão molecular representada pelo termo hiperbólico C o que não se verifica no último. Na cromatografia líquida, o efeito convectivo é mais intenso que o molecular e por isso esse termo desaparece, contrariando o comportamento quando utilizado fluido nas proximidades do ponto crítico, onde as difusões molecular e turbilhonar estão presentes e são demonstradas a partir desse termo C .

Somando-se o fato de que os valores do número de *Peclet* (Pe) para sistemas cromatográficos que utilizam fluido nas proximidades do ponto crítico são baixos em relação aos que usam eluente líquido e valendo-se da proporcionalidade inversa de Pe com a dispersão axial D_L , confirma-se que os valores de D_L obtidos são significantes. Dessa forma, representam e confirmam o efeito da difusão molecular e dos efeitos de turbilhonamento no sistema.

Segundo DUAN *et al.* (1998) e WANG & CHING (2002), como substâncias quirais apresentam propriedades físico-químicas idênticas e a dispersão axial em separações enantioméricas é determinada pela vazão e não pela difusão molecular, o coeficiente de dispersão deveria ser aproximadamente o mesmo para os dois enantiômeros. Porém, segundo os resultados expressos na Tabela 4.7, houve uma variação deste coeficiente entre os enantiômeros do mitotano e alguns autores atribuem esse comportamento a

erros experimentais enquanto outros à distribuição do tamanho de partícula da FEQ e a irregularidade das mesmas (DUAN *et al.*, 1998; WANG & CHING, 2002).

Os valores de k_m para cada enantiômero são estatisticamente iguais e, comparando-os aos valores obtidos por DIAS (2007) na enantioseparação do mitotano por cromatografia líquida, verificou-se o comportamento esperado: a transferência de massa é mais rápida em fluidos nas proximidades do ponto crítico que em fases móveis líquidas como pontua CARRILHO *et al.* (2001).

4.2.4. Avaliação da influência da temperatura no equilíbrio de adsorção

O estudo termodinâmico é uma estratégia para o entendimento da essência do reconhecimento quiral mais profundamente (WENG *et al.*, 2005). Associado com as estruturas dos solutos de prova, certos aspectos significativos de mecanismos do reconhecimento quiral podem ser obtidos (WENG *et al.*, 2004). Recentemente, muitos autores como PIRKLE (1991), WITTE *et al.* (1992), PAPADOPOULOU-MOURKIDOU (1989) e MACAUDIERE *et al.* (1989) têm reportado casos nos quais a variação da temperatura pode alterar as seletividades quirais (SMITH *et al.*, 1995).

Para a avaliação do efeito da variação de temperatura no processo de separação do mitotano mantendo constantes as demais variáveis, adição de 14% de metanol como co-solvente a 160 bar, foi possível se obter os dados que seguem na Tabela 4.8 com os respectivos desvios padrão em relação à triplicata experimental.

Tabela 4.8. Parâmetros cromatográficos para a enantioseparação do mitotano nas condições mais promissoras e a diferentes temperaturas.

T (K)	ρ (g/mL)	α	k_S	k_R	He_S	He_R
303,15	0,72	1,45 (0,01)	0,4 (0,01)	0,5 (0,01)	0,4 (0,02)	0,6 (0,02)
308,15	0,71	1,36 (0,02)	0,7 (0,04)	0,9 (0,05)	0,8 (0,005)	1,1 (0,02)
313,15	0,69	1,26 (0,01)	0,8 (0,05)	1 (0,05)	1 (0,05)	1,2 (0,05)

Conc = 1 mg/mL, FM = CO₂ + 14% metanol, P = 160 bar, V_{inj} = 50 μ L.

A seletividade é determinada por uma contribuição entálpica que decresce com a temperatura e uma contribuição entrópica que pode ser independente da temperatura (YANG *et al.*, 2005). À medida que a temperatura foi aumentada entre 303,15 e 313,15 K,

o fator de separação (α) dos enantiômeros do mitotano decresceu assim como na separação dos enantiômeros do ibuprofeno a 160 bar e com adição de 6 e 8% de isopropanol ao CO₂ supercrítico, realizada por JOHANNSEN (2001) quando a temperatura do processo foi variada entre 303,15 e 323,15 K. Segundo KÜSTERS & SPÖNDLIN (1996), desde que o fator de separação é relacionado à trocas de energia livre de associação e o último depende da interação entre as trocas na entalpia e entropia, à baixa temperatura o fator de separação pode aumentar com simultânea alteração da ordem de eluição.

Já as constantes de Henry para os enantiômeros do mitotano aumentaram proporcionalmente ao aumento da temperatura na faixa estudada. Na separação de 1-fenil-1-propanol em FEQ *Chiralcel OD* usando metanol como solvente modificador adicionado ao CO₂ supercrítico, RAJENDRAN *et al.* (2005a) observaram que, da mesma forma que para o mitotano, a constante de Henry a 313K foi superior ao valor obtido para 303K a alguns valores de pressão dentro da faixa estudada, entre 120 e 220 bar. O efeito esperado seria o oposto, contudo esse comportamento quando se utiliza fluido nas proximidades do ponto crítico é justificado no momento em que a densidade é a propriedade governante mais propriamente que à pressão. Como o aumento da temperatura ocasiona uma redução nos valores da densidade do fluido nas proximidades do ponto crítico, há uma diminuição do poder de solvatação da fase móvel o que resulta no aumento da constante de Henry proporcionalmente à temperatura, nessa faixa estudada (WENDA & RAJENDRAN, 2009).

Os coeficientes angular e linear dados pela relação expressa no gráfico (Figura 4.5) permitiram a definição da diferença de entalpia de adsorção e da entropia do sistema na faixa de temperatura entre 303,15 e 313,15 K, cujos valores estão expostos na Tabela 4.8.

Plotando-se $\ln \alpha$ dos enantiômeros do mitotano à pressão constante versus $1/T$, foi possível se obter uma reta bem ajustada. Seguindo essa correlação linear não menor que 0,99, de acordo com WENG *et al.* (2004) pode-se assumir que os enantiômeros interagem com o seletor quiral por mecanismos associativos simples e que o equilíbrio solvatação-dessolvatação não obscura o processo de associação dos enantiômeros com a FEQ. Ainda, segundo WENG *et al.* (2004) e (2005), valores negativos de $\Delta\Delta H^\circ$ e $\Delta\Delta S^\circ$, como o obtido e mostrados na Tabela 4.9, indicam que a retenção é conduzida entalpicamente. Os parâmetros termodinâmicos $\Delta\Delta H^\circ$ e $\Delta\Delta S^\circ$ caracterizam a separação dos

enantiômeros e estão acompanhados dos desvios padrão em relação à triplicata experimental.

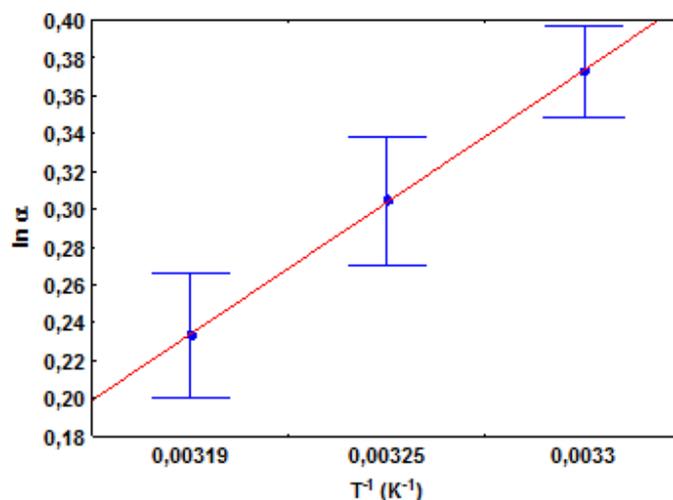


Figura 4.5. Gráfico semi-logarítmico do fator de separação em função da temperatura. Conc = 1 mg/mL, T = 30, 35 e 40°C, FM = CO₂ + 14% metanol, P = 160 bar, V_{inj} = 50 µL.

Tabela 4.9. Parâmetros de Gibbs-Helmholtz para a enantioseparação do mitotano.

$\Delta\Delta H^\circ$ (kJ/gmol)	$\Delta\Delta S^\circ$ (J/K.gmol)	r^2	T_{iso} (°C)
-1,32 (0,06)	-3,99 (0,2)	0,99	58,35 (3,95)

Conc = 1 mg/mL, FM = CO₂ + 14% metanol, P = 160 bar, V_{inj} = 50 µL.

Essa mesma correlação foi obtida por YANG *et al.* (2005) observaram para os enantiômeros do naproxeno utilizando a mesma FEQ, *Kromasil CHI-TBB*, e CO₂ supercrítico adicionado de isopropanol como eluente, à pressão constante e na faixa de temperatura entre 293 e 323 K. Dessa forma, a relação que se estabelece é que a seletividade aumenta com o decréscimo da temperatura.

A temperatura isoenantiosseletiva (T_{iso}), determinada para a enantioseparação do mitotano como 58,35°C ou 331,50 K, é definida como a temperatura na qual os termos de entalpia e entropia estão balanceados ($\Delta\Delta G^\circ = 0$) e não há a enantioseparação, ou seja, $\alpha = 1$. Segundo CIRILLI & LA TORRE (1998) e SCHLAUCH & FRAHM (2001), acima deste valor a enantioseparação é controlada entropicamente e conseqüentemente abaixo dele, entalpicamente e uma reversão na ordem de eluição pode ser observada. Dada a amplitude do valor da temperatura isoenantiosseletiva, ainda que no limite inferior do

intervalo com confiança de 98%, há a possibilidade da temperatura de trabalho se manter abaixo da T_{iso} . Já SU *et al.* (2009) pontua que quando se trabalho com fluidos nas proximidades do ponto crítico, se $|\Delta\Delta H^\circ|$ for superior a $|T.\Delta\Delta S^\circ|$, a enantioseparação é conduzida entalpicamente. Analisando mais uma vez a amplitude dos valores de $\Delta\Delta H^\circ$ e $\Delta\Delta S^\circ$ e se T for considerada como a temperatura de trabalho, a possibilidade dessa afirmação se confirmar é superior à possibilidade contrária.

No gráfico expresso pela Figura 4.6, os coeficientes angular e linear permitiram que se definissem os valores da entalpia e da entropia para cada um dos enantiômeros do mitotano no processo de transferência entre as fases móvel e estacionária entre 303,15 e 313,15 K, expressos na Tabela 4.10.

Quando os gráficos de van't Hoff apresentam um comportamento linear entre o logaritmo dos fatores de retenção e separação e o inverso da temperatura, segundo WENG *et al.* (2004), a FEQ não sofreu mudanças de conformação na faixa de temperatura estudada. Dessa forma, não houve mudanças na FEQ quando a enantioseparação do mitotano foi estudada entre 303,15 e 313,15 K e, neste caso, o mecanismo de reconhecimento quiral permaneceu inalterado o que corresponde que os parâmetros termodinâmicos são independentes da temperatura (CIRILLI *et al.*, 2001)

Os parâmetros termodinâmicos ΔH° e ΔS° descrevem a retenção do analito e estão acompanhados dos desvios padrão em relação à triplicata experimental.

Tabela 4.10. Parâmetros termodinâmicos para a enantioseparação do mitotano.

ΔH°_s (kJ/gmol)	ΔS°_s (J/K.gmol)	r^2
7,16 (0,7)	22,71 (2,3)	0,95
ΔH°_R (kJ/gmol)	ΔS°_R (J/K.gmol)	r^2
5,84 (0,7)	18,72 (2,2)	0,93

Conc = 1 mg/mL, FM = CO₂ + 14% metanol,

P = 160 bar, V_{inj} = 50 μ L.

De acordo com SMITH *et al.* (1995), o efeito da temperatura sobre a retenção na cromatografia com fluido nas proximidades do ponto crítico difere do efeito quando se utiliza HPLC: no primeiro caso, o comportamento padrão normal é que a retenção aumente inicialmente durante o aquecimento, mas atinja um máximo e então decresça substancialmente para temperaturas mais elevadas. Dessa forma, para temperaturas pouco acima da temperatura ambiente, os gráficos $\ln k \times 1/T$ possuem

sinais opostos quando comparados aos mesmos gráficos para experimentos em HPLC e na enantioseparação do mitotano, não foi atingida essa temperatura máxima dentro da faixa estudada.

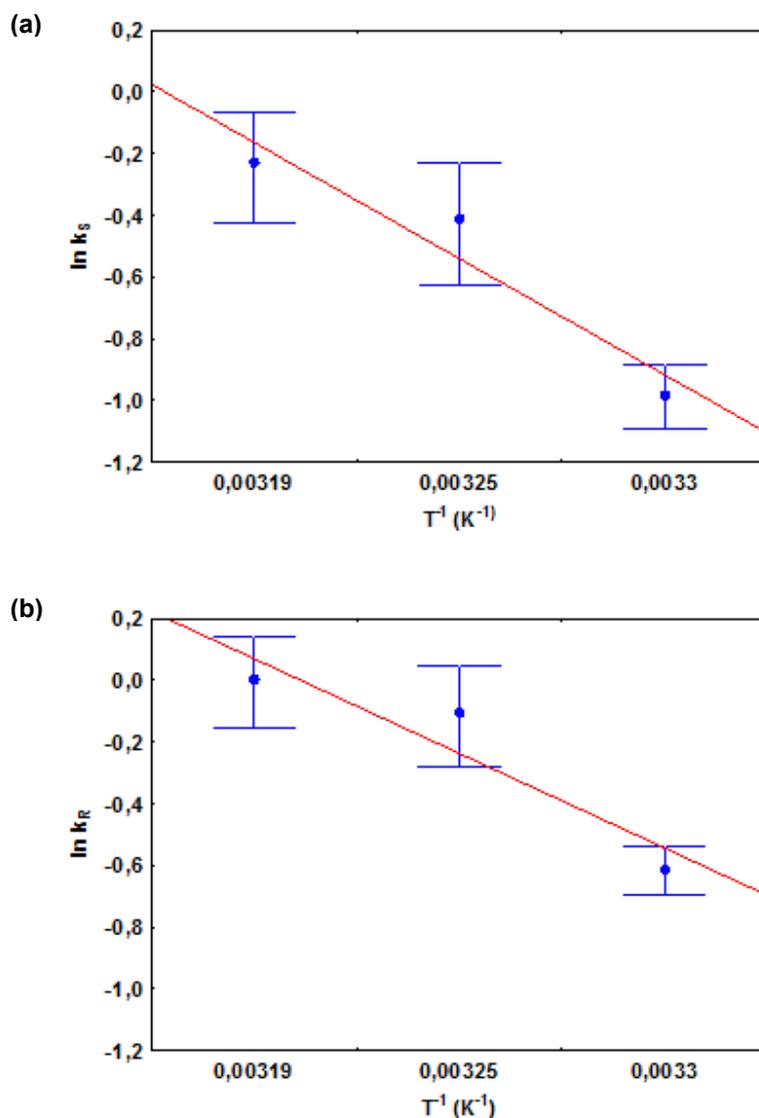


Figura 4.6. Gráfico semi-logarítmico do fator de retenção em função da temperatura para os enantiômeros 1 (a) e 2 (b). Conc = 1 mg/mL, T = 30, 35 e 40°C, FM = CO₂ + 14% metanol, P = 160 bar, V_{inj} = 50 µL.

Segundo ASNIN *et al.* (2005), quando ambas, entalpia e entropia possuem o mesmo sinal, contribuições opostas para a energia livre de adsorção são fornecidas. Como a variação de entropia está relacionada a variações de ordem-desordem de um

sistema, quanto mais randômico for esse sistema, maior a sua entropia. Assim, valores positivos de ΔS° indicam um aumento na desordem por conta da transição do estado ligado do soluto à FEQ ao estado dissolvido na fase móvel (SCHLAUCH & FRAHM, 2001).

4.3. Experimentos com soluções concentradas

4.3.1. Avaliação do equilíbrio 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). Há uma diversidade de métodos para determinar as isotermas de equilíbrio nos processos cromatográficos e dentre eles tem-se o método inverso que consiste em calcular as isotermas a partir dos perfis de sobrecarga na coluna e em estimar parâmetros de valores desconhecidos para um modelo de isoterma de adsorção pré-definido, que maximiza a probabilidade desse modelo prever os valores a partir dos experimentos de sobrecarga (CAVAZZINI *et al.*, 2003; ARAÚJO *et al.*, 2008).

A primeira escolha de um modelo de isoterma não-linear em cromatografia é a isoterma de Langmuir competitiva cuja condição para a consistência termodinâmica impõe que a capacidade de saturação seja a mesma para ambos enantiômeros, assumindo a homogeneidade da superfície adsorvente (ARAÚJO *et al.*, 2008; ARNELL *et al.*, 2005; FELINGER *et al.*, 2003).

Foram ajustados três modelos de isotermas para descrever a adsorção do mitotano na FEQ *Kromasil CHI-TBB*: Langmuir não-competitivo (1), Langmuir competitivo (2) e Langmuir competitivo com denominadores diferentes para cada enantiômero (3). Os dois primeiros modelos possuem quatro parâmetros, enquanto que o terceiro apresenta seis parâmetros ajustáveis. Os perfis calculados e experimentais obtidos a partir de cada modelo de isoterma estudado são mostrados nas Figuras 4.7, 4.8 e 4.9, com seus respectivos desvios padrão.

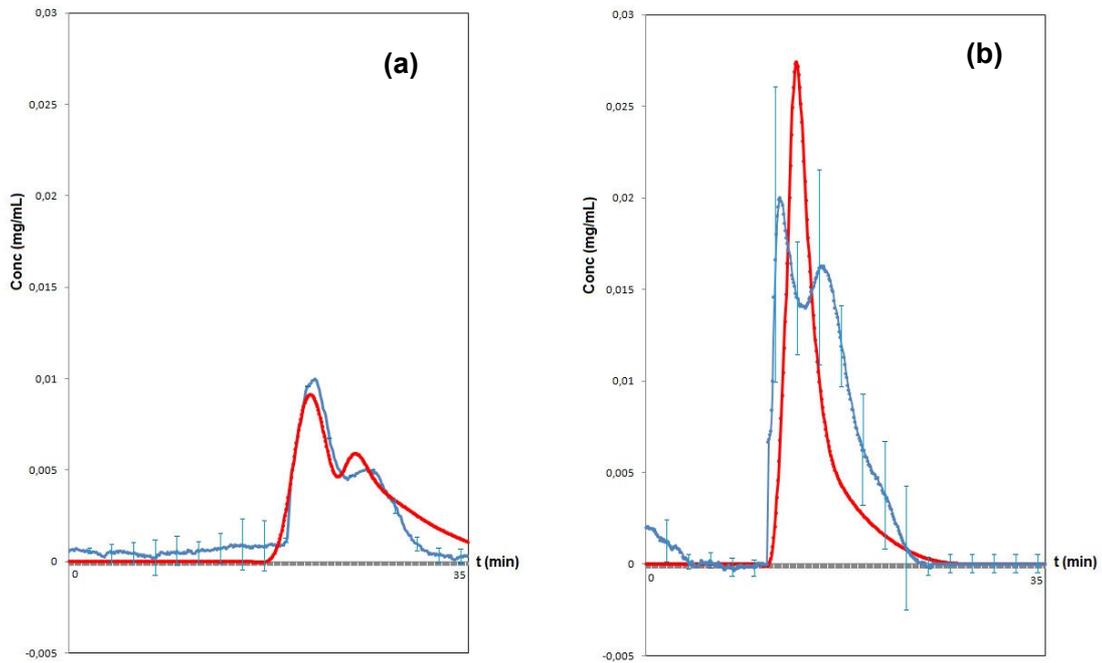


Figura 4.7. Perfis calculados (—) e experimentais (—) a partir da isoterma de Langmuir não-competitivo, para 100 μL (a) e 200 μL (b).

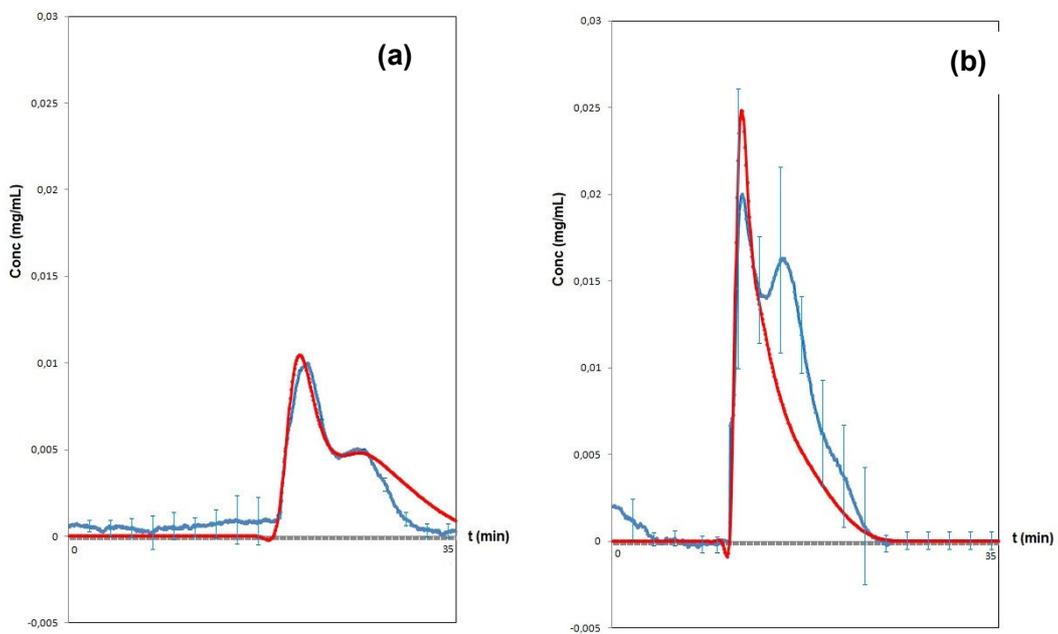


Figura 4.8. Perfis calculados (—) e experimentais (—) a partir da isoterma de Langmuir competitivo, para 100 μL (a) e 200 μL (b).

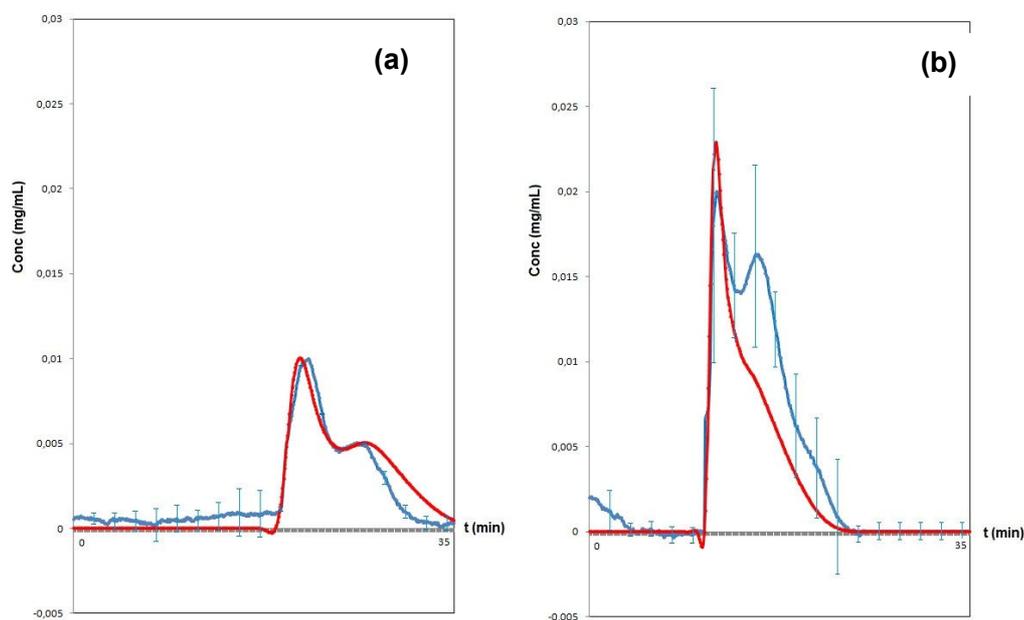


Figura 4.9. Perfis calculados (—) e experimentais (—) a partir da isoterma de Langmuir competitivo com denominadores diferentes para cada enantiômero, para 100 μL (a) e 200 μL (b).

Os parâmetros para os modelos de isotermas estimados estão listados na Tabela 4.11, com seus respectivos desvios padrão.

Tabela 4.11. Parâmetros dos modelos de isotermas.

Modelo	Langmuir não-competitivo	Langmuir competitivo	Langmuir competitivo com denominadores diferentes para cada enantiômero
Nº iter.	5	4	9
A ₁	0,7 (0,0003)	1,1 (0,0002)	1,1 (0,0004)
A ₂	2,1 (0,001)	1,7 (0,0006)	1,7 (0,0004)
B ₁	9,3 (0,006)	35,5 (0,009)	32 (0,01)
B ₂	96,4 (0,06)	48,9 (0,015)	32,4 (0,02)
BB ₁	-	-	45,4 (0,01)
BB ₂	-	-	57,4 (0,01)
Pe	401,86 (0,0003)	435,5 (0,4)	438 (0,1)
SQR	5523	4594,5	4235,35

“-”: parâmetro ausente neste modelo.

Os valores dos parâmetros A_1 e A_2 corresponderam aos valores das constantes de Henry obtidos à diluição infinita para os enantiômeros S e R, para a mesma condição experimental, assim como o esperado, para os modelos 2 e 3.

Os parâmetros B_1 e B_2 obtiveram valores próximos, indicando que os efeitos de concentração de ambas as espécies são similares quando foi avaliada a quantidade adsorvida do enantiômero mais retido. Além disso, essa mesma igualdade indicou que não houve efeitos competitivos para o enantiômero S (ou 1) quando considerado o modelo 3 de isoterma de adsorção.

Opostamente, BB_1 e BB_2 obtiveram valores diferentes e então a concentração do mais retido influenciou mais a quantidade adsorvida do enantiômero menos retido quando comparado à influência da concentração do enantiômero menos retido. Essa desigualdade indicou que o enantiômero R (ou 2) mais retido contribui de forma diferente na quantidade adsorvida. Tal efeito é esperado no momento em que o enantiômero mais retido deve deslocar o menos retido na coluna.

Os valores do número de Peclet (Pe) também foram definidos para cada um dos modelos de isotermas de adsorção estudado, e corresponde ao ajuste dos valores experimentais e calculados em condições concentradas. Comparando-se os valores obtidos nessas condições, 401,86, 435,51 e 438, com o valor obtido para o número de Peclet definido em condições diluídas, verificou-se a superioridade desse último de cerca de quatro vezes em relação aos anteriores. Sendo assim, é válido ressaltar que o valor obtido em condições diluídas está sujeito a algumas fontes de erro, sobretudo relacionados à ausência de separação completa.

4.4. Determinação das condições de operação

4.4.1. Processo em batelada

A otimização sistemática de um processo que utiliza cromatografia com fluido nas proximidades do ponto crítico que maximize a produtividade e ainda reduza o consumo de solvente ainda é escassa na prática. Ela envolve grande número de instrumentos de controle e parâmetros envolvidos neste tipo de processo, incluindo vazão, pressão, composição do modificador, tamanho da partícula e caracterização da FEQ (WENDA *et al.*, 2011).

Pretendendo abordar essa questão, duas funções objetivo foram escolhidas. A função objetivo é uma função de variáveis de decisão que são selecionadas como parâmetros de performance, ou seja, condições de separação que influenciam significativamente o desempenho do processo, e foram definidas para a enantioseparação do mitotano a maximização da produtividade e a minimização do consumo de solvente. O percentual de recuperação de cada um dos enantiômeros também foi estabelecido. A velocidade ótima do fluido foi definida como 1,7 cm/min, de acordo com a análise dos gráficos de van Deemter.

As variáveis de desempenho obtidas para cada valor de concentração de alimentação, considerando-se três níveis de pureza para cada, estão dispostas na Tabela 4.12 para volume de injeção de 100 µL.

Tabela 4.12. Condições de operação para diferentes concentrações de alimentação de mitotano racêmico variando-se a pureza, para volume de injeção de 100 µL.

C_{alim} (mg/mL)	Pur (%)	Recup_S (%)	Produtiv_S (mg/h)	CSolv (L/g_S)	Recup_R (%)	Produtiv_R (mg/h)	CSolv (L/g_R)
0,1	0,9	86,6	10,8	6895	85	10,6	7023
0,1	0,95	73,7	9	8101	71	9	8405
0,1	0,98	58,5	7,3	10201	41	5	14557
0,5	0,91	91	56	1327	89	55	1353
0,5	0,95	82	50,5	1474	82,8	51	1459
0,5	0,98	68	41,7	1782	69,7	36,8	2024
1	0,9	88,3	112,6	660	87,6	112	666
1	0,95	74,3	95	785	77	98,6	754
1	0,98	57,6	73,4	1013	52,8	67,4	1104,5
1,5	0,9	79,7	148	503	81	150	495
1,5	0,95	62,7	116,3	640	67	124	600
1,5	0,98	40	74	1003	42	77,7	958
2	0,87	79	201,4	369,5	78,6	200	371
2	0,9	70	178,5	417	73	186,7	398,5
2	0,95	45,3	115,7	643	57,6	147	506
2,5	0,85	72	220	338	74,7	228	326
2,5	0,9	56	171	435	65	198,6	375
2,5	0,95	26	80	929	49	149,8	497
3	0,85	61,5	226,5	328,5	68,5	252	295
3	0,9	38,7	142,4	522,5	57,5	211,6	352
3	0,95	15,7	58	1284	43	157,7	472
4	0,85	37,5	183,6	405	56	273,4	272
4	0,9	20	96,6	770	47	230,5	323
4	0,95	5	24,6	3018	33,8	165,5	449,5
5	0,85	23,4	143	520	47,4	290	257
5	0,9	12,3	75	992	38,6	236	315,4
5	0,95	4	24,5	3043	27,5	168	443

As Figuras 4.10, 4.11 e 4.12 ilustram o comportamento dessas variáveis em função da concentração de mistura racêmica considerada.

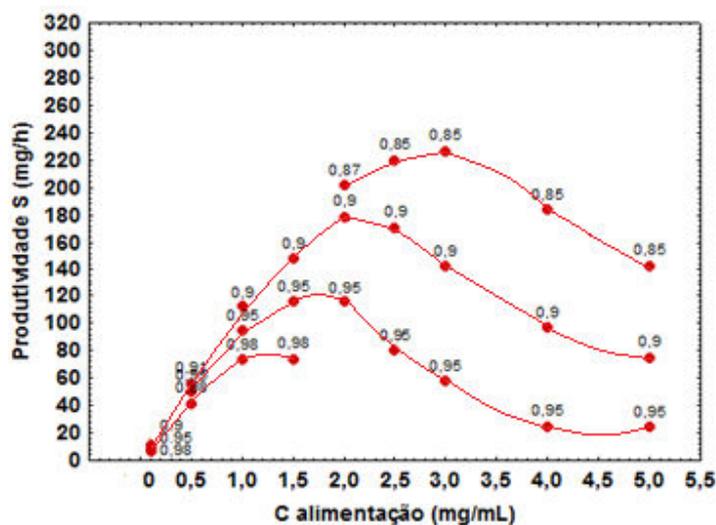


Figura 4.10. Produtividade em relação aos enantiômeros S do mitotano como função da concentração de alimentação da mistura racêmica para volume de injeção de 100 μ L, considerando-se três percentuais de pureza superiores à 85%.

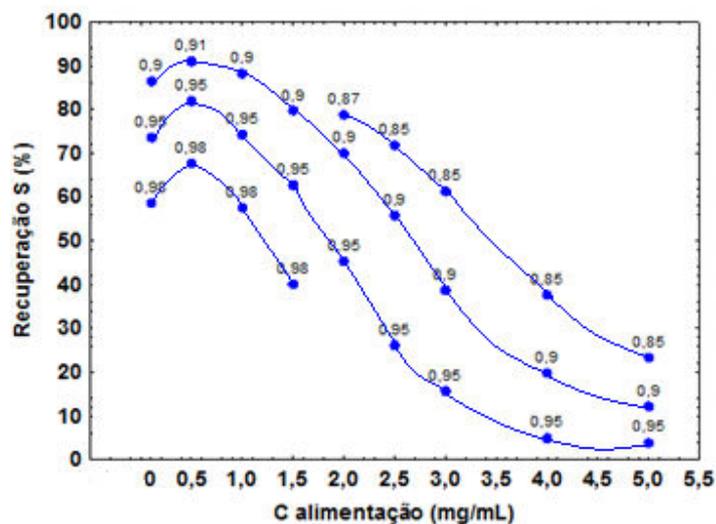


Figura 4.11. Recuperação em relação aos enantiômeros S do mitotano como função da concentração de alimentação da mistura racêmica para volume de injeção de 100 μ L, considerando-se três percentuais de pureza superiores à 85%.

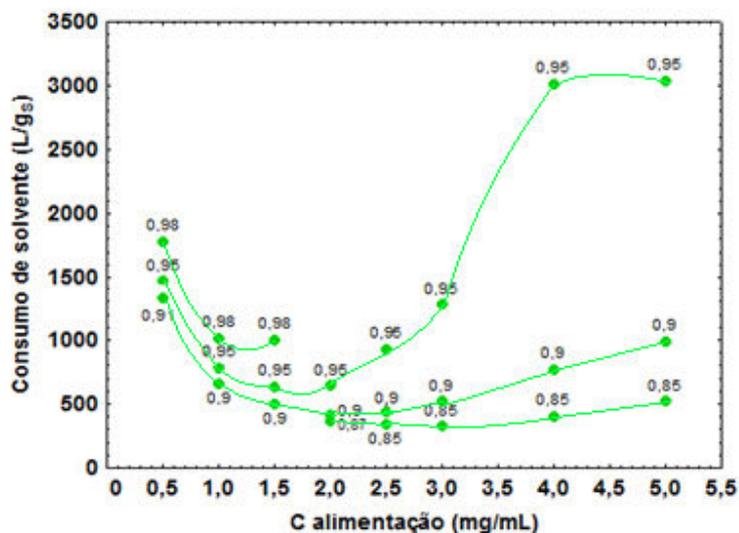


Figura 4.12. Consumo de solvente em relação aos enantiômeros S do mitotano como função da concentração de alimentação da mistura racêmica para volume de injeção de 100 μ L, considerando-se três percentuais de pureza superiores à 85%.

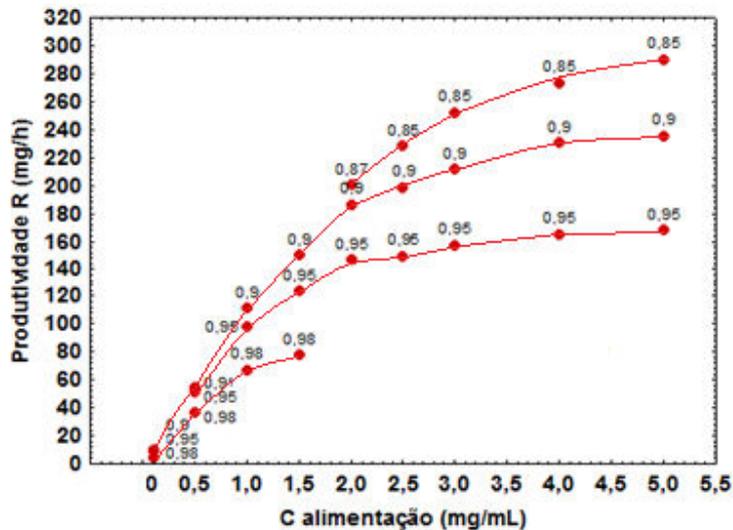


Figura 4.13. Produtividade em relação aos enantiômeros S do mitotano como função da concentração de alimentação da mistura racêmica para volume de injeção de 200 μ L, considerando-se três percentuais de pureza superiores à 85%.

Da mesma forma, se procedeu para o volume de injeção de 200 μL e os resultados estão dispostos na Tabela 4.13 e Figuras 4.13, 4.14 e 4.15.

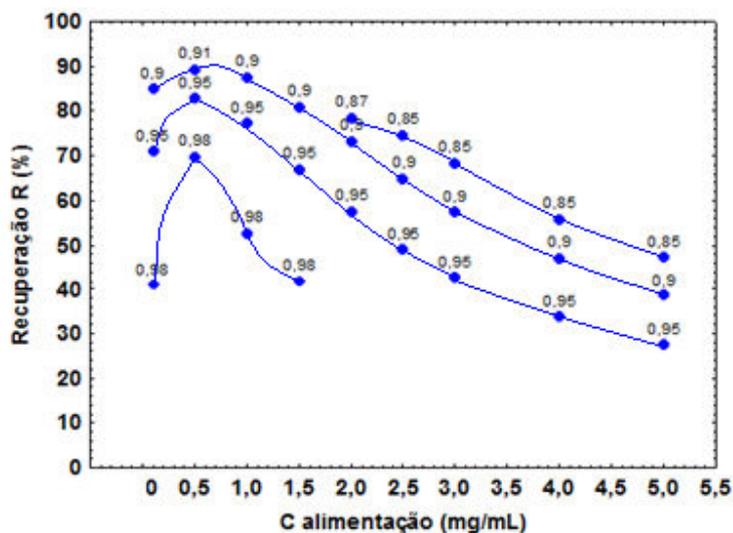


Figura 4.14. Recuperação em relação aos enantiômeros S do mitotano como função da concentração de alimentação da mistura racêmica para volume de injeção de 200 μL , considerando-se três percentuais de pureza superiores à 85%.

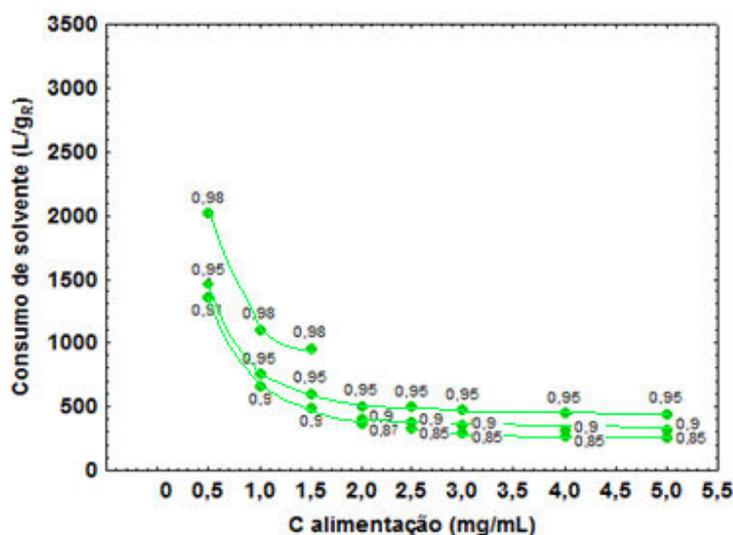


Figura 4.15. Recuperação em relação aos enantiômeros S do mitotano como função da concentração de alimentação da mistura racêmica para volume de injeção de 200 μL , considerando-se três percentuais de pureza superiores à 85%.

Considerando-se o volume de injeção de 100 µL de solução de mitotano racêmico, com base nos dados obtidos, foi possível observar que quanto mais concentrada a solução de alimentação, menor o percentual recuperado de cada enantiômero, porém maior a produtividade do processo e menor o consumo de solvente por massa de espécie enantiomérica .

Contudo, essa observação é válida para concentrações inferiores ou iguais à 3 mg/mL. A partir desse ponto, a produtividade tendeu à redução paralelamente à recuperação da espécie, considerando-se sobretudo o comportamento para o S-mitotano, o enantiômero de maior interesse. Ainda, a partir do mesmo valor, picos de consumo de solvente foram detectados quando elevada à 95% a pureza do material recolhido.

Tabela 4.13. Condições de operação para diferentes concentrações de alimentação de mitotano racêmico variando-se a pureza, para volume de injeção de 200 µL.

C_{alim} (mg/mL)	Pur (%)	Recup_S (%)	Produtiv_S (mg/h)	CSolv (L/g_S)	Recup_R (%)	Produtiv_R (mg/h)	CSolv (L/g_R)
0,1	0,91	89	22,5	3311	87,6	22	3368
0,1	0,95	80	20	3679	77,6	19,6	3805
0,1	0,98	64	16	4604	52	13	5643
0,5	0,9	89	109,5	679	87	107	693
0,5	0,95	75,4	93	801	76,6	94	788
0,5	0,98	56	69	1081	52	64	1162
1	0,85	83,	209	356	82	205,4	362
1	0,9	68,6	172	432	72,6	182	408
1	0,93	55,7	140	532	65,5	164,6	452
1,5	0,88	51	189,7	392	62	230	324
1,5	0,9	41	153	486	58	215	346
1,5	0,95	18,6	69	1080	43,4	160,5	463,5
2	0,85	35	170	438	56,6	277	269
2	0,9	17	83	894	46,6	228	327
2	0,95	7	34,5	2159	33,4	163	455
2,5	0,88	15	95	783	42	267	279
2,5	0,9	10	63	1179	38	241	309
2,5	0,95	2,7	17	4363	27	172	434
3	0,85	15,5	114	653	41	300	248
3	0,87	10,5	77,3	962	38	276,5	269
3	0,9	6	46,5	1601,5	33	242,5	307
4	0,85	8	82	908	31,5	316,6	235
4	0,88	4,7	46,7	1592	27	275	270
5	0,85	4,5	55	1345	25	303	245
5	0,9	2	26	2826	20,5	249	298,5
5	0,95	0,7	8,7	8517	14,4	175,5	424

Duas outras observações são pertinentes: quanto maior a pureza exigida da espécie coletada, menor o percentual de recuperação e menor a produtividade aliados ao

alto consumo de solvente, como esperado. Recuperações acima de 80% foram atingidas até 1 mg/mL de alimentação.

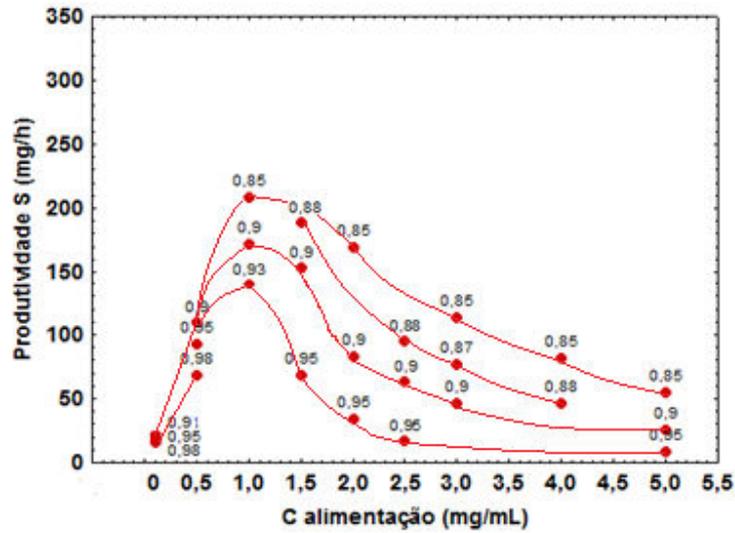


Figura 4.16. Produtividade em relação aos enantiômeros R do mitotano como função da concentração de alimentação da mistura racêmica para volume de injeção de 100 μ L, considerando-se três percentuais de pureza superiores à 85%.

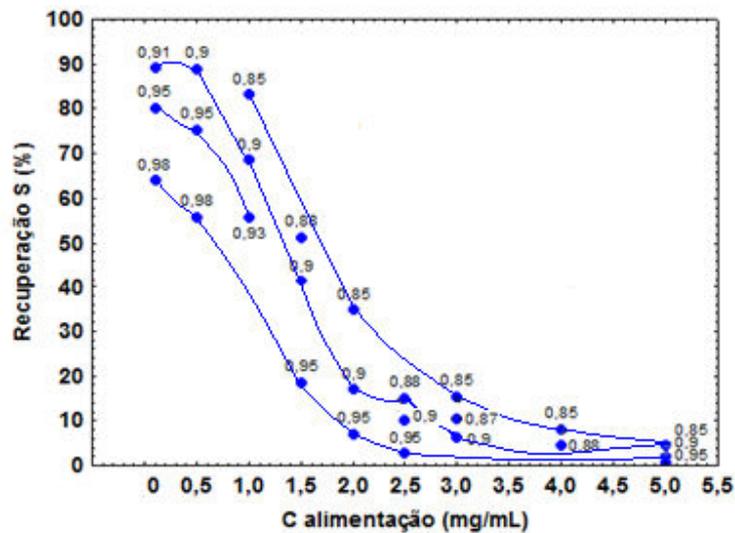


Figura 4.17. Recuperação em relação aos enantiômeros R do mitotano como função da concentração de alimentação da mistura racêmica para volume de injeção de 100 μ L, considerando-se três percentuais de pureza superiores à 85%.

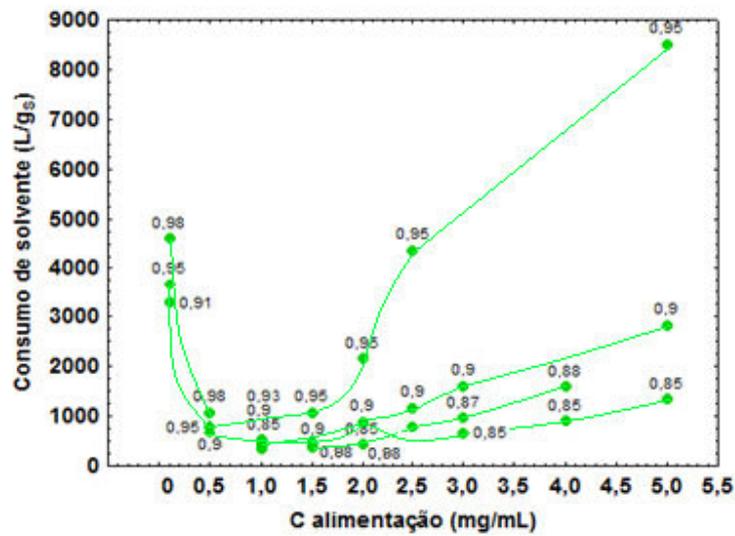


Figura 4.18. Consumo de solvente em relação aos enantiômeros R do mitotano como função da concentração de alimentação da mistura racêmica para volume de injeção de 100 μ L, considerando-se três percentuais de pureza superiores à 85%.

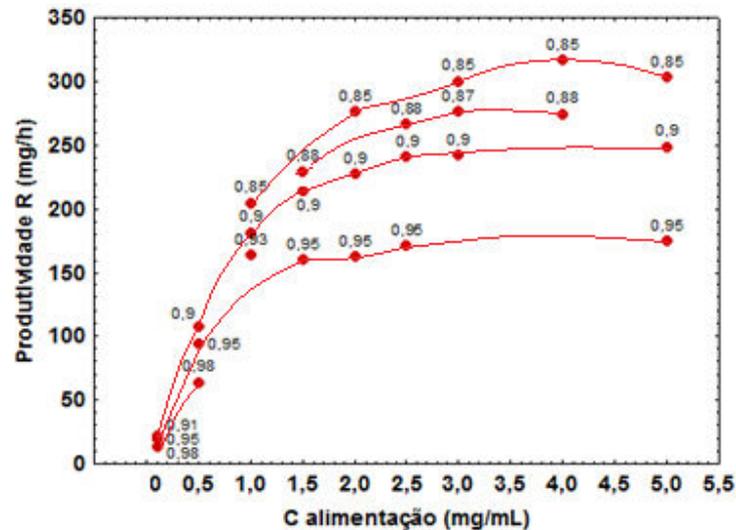


Figura 4.19. Produtividade em relação aos enantiômeros R do mitotano como função da concentração de alimentação da mistura racêmica para volume de injeção de 200 μ L, considerando-se três percentuais de pureza superiores à 85%.

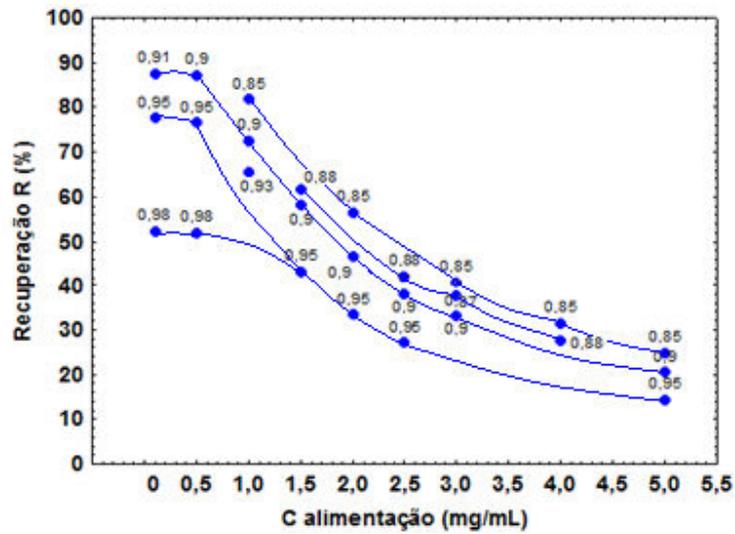


Figura 4.20. Recuperação em relação aos enantiômeros R do mitotano como função da concentração de alimentação da mistura racêmica para volume de injeção de 200 μ L, considerando-se três percentuais de pureza superiores à 85%.

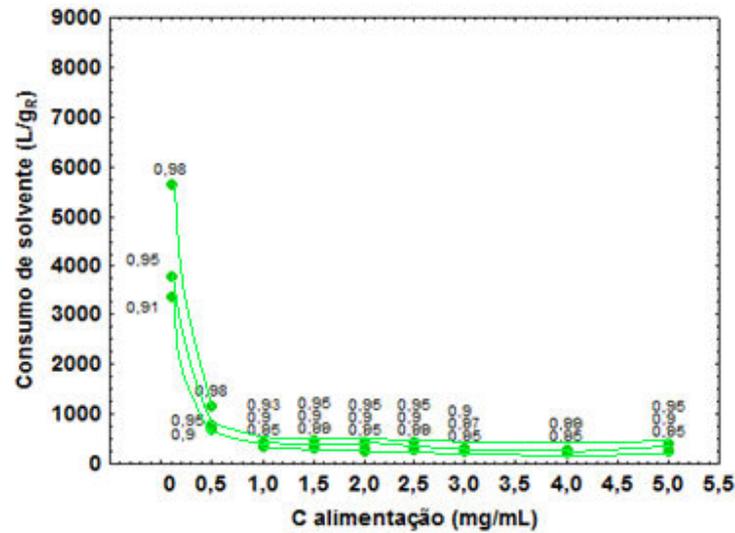


Figura 4.21. Consumo de solvente em relação aos enantiômeros R do mitotano como função da concentração de alimentação da mistura racêmica para volume de injeção de 200 μ L, considerando-se três percentuais de pureza superiores à 85%.

Para o volume de injeção de 200 μL de solução de mitotano racêmico, o comportamento obtido anteriormente não se manteve para toda faixa analisada, sobretudo em relação ao enantiômero desejado, o S-mitotano. De acordo com as informações que se tem, quanto mais concentrada a solução de alimentação, menor o percentual recuperado de cada enantiômero e maior a produtividade em termos da massa do enantiômero por tempo, até a alimentação de 1 mg/mL. Soluções mais concentradas do que esta sofreram um decréscimo na produtividade e o percentual recuperado manteve-se abaixo de 50%. Para essa concentração considerada, o consumo de solvente foi o menor, tendendo a um leve acréscimo com surgimento de picos para concentrações a partir de 1,5 mg/mL.

Igualmente ao que foi constatado para o volume de injeção de 100 μL , quanto mais pura a fração coletada, menor o percentual de recuperação e a produtividade e maior o consumo de solvente. Recuperações acima de 80% foram atingidas também até 1 mg/mL de alimentação.

Assim, injetando-se uma massa de cerca de 0,2 mg de mitotano racêmico e mantendo-se a pureza da fração recolhida até 85%, foi possível aliar os ótimas para produtividade e consumo de solvente, recuperando-se em torno de 80% do produto desejado.

4.4.2. Processo em LMS

4.4.2.1. Definição das fases estacionária e móvel

Para selecionar as fases estacionária quiral e móvel para separação do mitotano racêmico utilizando LMS, partiu-se de duas alternativas de combinações de solventes e FEQ adequadas em estudos anteriores realizados no Laboratório de Propriedades Reológicas e Coloidais da FEQ/Unicamp.

Testes variando a concentração da amostra (mg/mL), o volume de injeção (μL) e a vazão de trabalho (mL/min) foram realizados utilizando-se a alternativa 1 - 95% de hexano e 5% de acetato de etila e a FEQ *Kromasil CHI-TBB* - e a alternativa 2 - 60% de isopropanol e 40% de metanol e a FEQ *Chiralpak AD* - já citadas anteriormente.

Quando comparadas as separações realizadas com ambas alternativas para injeções de 5 μL , concentração de 0,2 mg/mL e vazão de 0,5 mL/min, a separação do mitotano racêmico utilizando 60% de isopropanol e 40% de metanol como eluente e

Chiralpak AD como fase estacionaria, foi mais promissora com uma seletividade media de 1,21 enquanto que para a primeira alternativa, a seletividade permaneceu em media 1,07.

Desta forma, as analises foram realizadas a partir de então se utilizando 60% de isopropanol e 40% de metanol como eluente e *Chiralpak AD* como fase estacionaria.

4.4.2.2. Solubilidade da amostra

Três concentrações conhecidas de solução de mitotano racêmico foram utilizadas na avaliação da solubilidade: 15,84, 19,56 e 29,6%. Após o procedimento politérmico, a seguinte curva de solubilidade foi gerada:

$$Conc = \exp(18,3549 + (-4858,3713)/(T + 273))$$

Para 25°C, a temperatura de trabalho, foi definida uma solubilidade máxima de 7,78% (cerca de 67 mg/mL).

4.4.2.3. Porosidades e constantes de Henry

As porosidades das quatro colunas (ϵ) são mostradas na Tabela 4.14.

Tabela 4.14. Valores das porosidades de cada coluna envolvida no processo de separação por LMS.

Coluna	ϵ
1	0,69
2	0,70
3	0,70
4	0,70

Dadas as isotermas lineares, as constantes de Henry para cada um dos enantiômeros nas quatro colunas que compõe o sistema são mostradas na Tabela 4.15.

Tabela 4.15. Valores das constantes de Henry para cada enantiômero do mitotano em cada uma das colunas envolvidas no processo de separação por LMS.

Coluna	He ₁	He ₂
1	0,87	3,15
2	0,90	3,30
3	0,88	3,09
4	0,89	3,04

4.4.2.4. Definição da região e pontos de operação

O processo de otimização de uma unidade de LMS está diretamente relacionado com o projeto da mesma, e os procedimentos de busca das melhores condições de operação sempre fazem uso de ferramentas de modelagem e simulação, uma vez que procedimentos de tentativa e erro não são aplicáveis em um processo deste porte. Otimizar a operação de um LMS consiste em prever as condições de operação tais como vazões em cada seção, tempo de permutação, que produzam, dada uma configuração física da unidade, uma ótima separação a um custo mínimo (AZEVEDO & RODRIGUES, 1999). Portanto, o objetivo é se obter os produtos desejados nas correntes de extrato e refinado, com a maior pureza possível, fazendo uso efetivo da total capacidade adsorviva do sólido adsorvente e minimizando o consumo de eluente. Dependendo do caso, o procedimento de otimização pode pretender minimizar e/ou maximizar um ou mais critérios de desempenho, que irão variar de acordo com cada processo em particular, dependendo principalmente de fatores econômicos.

Os primeiros esforços de busca das melhores condições de separação em unidades de leito móvel simulado foram apresentados por STORTI *et al.* (1993) utilizando modelos simplificados baseados na teoria do equilíbrio que desprezam efeitos de resistência à transferência de massa, efeitos de dispersão axial e assumem condições de equilíbrio termodinâmico na unidade. Seguiram-se a estes os trabalhos de STORTI *et al.* (1995) e MAZZOTTI *et al.* (1994, 1996). Como já descrito anteriormente, estes autores desenvolveram um procedimento para o projeto da unidade baseado na relação entre os fluxos mássicos em cada seção da unidade, que são os parâmetros chave de operação. Por este procedimento é possível obter-se uma série de relações entre os fluxos mássicos em cada seção da unidade que proporcionarão a completa separação dos compostos desejados e que tem como base apenas em informações sobre a isoterma de adsorção dos compostos e concentração de alimentação. Destas relações entre os fluxos mássicos pode-se obter as vazões, ou as velocidades em cada seção. Por esta abordagem, STORTI *et al.* (1993) e MAZZOTTI *et al.* (1994) mostraram que as condições de operação nas seções I e IV, onde o adsorvente e o eluente são regenerados, são relativamente simples. Entretanto, nas seções II e III, que são as seções chave para a separação, uma dada separação deve ser analisada no plano compreendido pelas variáveis m_2 e m_3 , onde pode-se projetar uma região de completa separação, ou seja, valores de m_2 e m_3 que, juntos, proporcionarão a recuperação do composto mais fortemente adsorvido puro na

corrente de extrato e o componente de menor afinidade adsortiva também puro na corrente de refinado.

Para o caso de separação de uma mistura binária com isoterma de adsorção linear, as restrições de fluxo reduzem-se as já descritas pelo conjunto de desigualdades dado pelas Equações (62), (63), (64) e (65).

É dessa forma descrita que a partir da inserção dos parâmetros referentes ao sistema (Tabela 4.16) e das constantes de Henry médias para cada enantiômero, o software de simulação *SMG-Guide*[®], obedecendo à condição de pureza do refinado e do extrato de igual ou superior a 99%, define os parâmetros de operação que estão descritos na Tabela 4.17.

Tabela 4.16. Propriedades do sistema LMS de enantioseparação.

Parâmetro	Valor
N	80
ϵ	0,70
d coluna	1 cm
L coluna	10 cm

Tabela 4.17. Valores dos parâmetros operacionais projetados para a completa enantioseparação do mitotano através do LMS.

Condição	Q_F (mL/min)	Q_D (mL/min)	Q_E (mL/min)	Q_R (mL/min)	t^* (s)
1	5	40	26,7	18,3	17
2	5	39	24	20	92
3	5	52	25	32	70
4	5	60	33	32	70
5	5	55	30	30	65
6	5	55	25	35	60

Estabelecidas estas condições operacionais, as variáveis de desempenho foram então ser avaliadas.

4.4.2.5. Avaliação das variáveis de desempenho

A Tabela 4.18 mostra as variáveis de desempenho projetadas para cada condição operacional definida anteriormente e as obtidas no experimento real para as mesmas condições.

Tabela 4.18. Valores das variáveis de desempenho projetadas e obtidas a partir dos dados experimentais para a enantioseparação do mitotano.

Cond.	Pur _E (%)	Pur _R (%)	Produtiv _E projetada (g/h*L)	Produtiv _E real (g/h*L)	CSolv _E projetada (L/g)	CSolv _E real (L/g)	Produtiv _R projetada (g/h*L)	Produtiv _R real (g/h*L)	CSolv _R projetada (L/g)	CSolv _R real (L/g)
1	67	91	83,68	56,07	0,67	1,01	57,35	52,19	0,98	1,08
2	78	54	75,22	58,67	0,73	0,94	62,68	33,85	0,88	1,63
3	79	23	78,35	61,90	0,91	1,15	100,29	23,07	0,71	3,10
4	92	60	103,43	95,15	0,79	0,86	100,29	60,18	0,81	1,35
5	67	88	94,02	63,00	0,80	1,19	94,02	82,74	0,80	0,91
6	62	94	78,35	48,58	0,96	1,55	109,69	103,11	0,69	0,73

Experimentalmente, a condição 1 de operação forneceu purezas do extrato e do refinado abaixo das previstas, 99 e 97% para o extrato e para o refinado, nessa ordem. Antes de prosseguir para as demais condições operacionais, diante da diferença entre os resultados estimados e experimentais, foi sugerido verificar o desempenho de cada uma das quatro colunas do sistema separadamente. Diante da constatação de que as colunas 1 e 4 apresentavam problemas, ambas foram empacotadas novamente e assim testadas mais uma vez, apresentando após um ótimo desempenho. Dado ainda que o volume morto do sistema de separação influencia na performance da separação no LMS, os 18 mL medidos para tanto foram contabilizados nas estimações dos parâmetros operacionais para a enantioseparação completa do mitotano racêmico.

Para a condição 2, as purezas experimentais alcançadas para o extrato e o refinado foram, mais uma vez, inferiores aos 99 e 96% estimados e desejados.

Novos valores de *He* foram calculados de forma a se verificar o que poderia estar ocasionando tal problema, contudo estes se mantiveram de acordo com os valores anteriores. As condições 3, 4, 5 e 6 foram operadas e da mesma forma, não tiveram êxito, alcançando-se purezas do extrato e do refinado como as expressas na Tabela 4.18.

Da mesma forma que a pureza, a produtividade do processo em relação ao extrato e ao refinado foi menor que a projetada quando considerada a pureza e a recuperação de ambos os enantiômeros de cerca de 99%. Como esperado, as menores perdas em produtividade para o extrato (8%) e o refinado (6%) aliados as maiores purezas foram obtidas nas condições que operaram com os maiores valores de vazão nessas duas correntes. O consumo de solvente foi maior que o desejado em uma faixa entre 6 e 77% em relação à quantidade definida nas condições projetadas para a pureza e a recuperação de ambos os enantiômeros de cerca de 99%.

Estes resultados indicam que a determinação da zona de completa separação pelo procedimento aplicado não se mostrou satisfatória. Isto pode ocorrer devido ao fato de a teoria do equilíbrio representar uma aproximação dos fenômenos reais envolvidos no processo, podendo apresentar desvios em relação aos valores exatos. No entanto, os resultados do modelo de equilíbrio podem ser utilizados como um passo inicial na determinação das melhores condições de operação da unidade. A partir destes resultados, os melhores valores para as variáveis m_1 e m_4 podem ser encontrados através de um método de tentativa e erro. Para se obter uma completa separação dos compostos, o valor de m_1 deve ser o menor possível desde que o sólido que passa à zona IV esteja totalmente isento do composto mais fortemente adsorvido. Assim, a zona I cumpre sua função e ao mesmo tempo minimiza-se o consumo de dessorvente. Já m_4 , pelo mesmo motivo, deve apresentar o maior valor possível desde que o fluido que passa à zona I esteja livre do componente menos adsorvido.

Contudo, mesmo que não atingida a enantioseparação do mitotano da forma desejada utilizando-se o LMS, ainda é possível traçar um paralelo entre esse tipo de processo e a separação em batelada com relação à produtividade do processo e o consumo de solvente. Segundo PEPPER *et al.* (2007), se utilizado líquido como solvente, a baixa produtividade e o maior consumo de solvente do processo em batelada faz com que o processo em LMS seja mais econômico e só não o seria caso fluido nas proximidades do ponto crítico fosse utilizado. Isso é confirmado quando se comparam as variáveis de performance de ambos processos para enantioseparação do mitotano, disponíveis nas Tabelas 4.12, 4.13 e 4.18.

Conclusões e Sugestões Futuras

Os estudos apresentados neste trabalho mostraram que a fase estacionária quiral *Kromasil CHI-TBB* e CO₂ nas proximidades do ponto crítico adicionado de um solvente modificador como fase móvel, são capazes de promover a enantioseparação do mitotano. Dessa forma, a cromatografia com fluido nas proximidades do ponto crítico mostrou ser um processo promissor nas circunstâncias estudadas para esse fármaco racêmico.

Condições adequadas para a separação foram alcançadas quando adicionados 14% de metanol ao CO₂ nas proximidades do ponto crítico a 160 bar e 35°C, propiciando uma seletividade de 1,47. A avaliação da seletividade em função da variação de pressão, mostrou que à 160 bar, um dos enantiômeros interagiu com maior intensidade com a fase sólida do que o outro e o volume parcial molar desse enantiômero na superfície da FEQ manteve-se menor que o da outra espécie em função de que quanto mais intensas as interações, maior a retração do volume parcial molar do enantiômero na superfície da fase estacionária. À pressão constante, o comportamento da seletividade foi uma forte função do potencial químico do mitotano adsorvido, significativamente superior para uma das espécies quando utilizado 7% de isopropanol e ainda mais quando adicionado 14% de metanol como solvente modificado.

Quando utilizado etanol e metanol, a retenção do mitotano foi mais influenciada pelas características da fase sólida e o potencial químico do soluto adsorvido foi mais dependente do percentual de co-solvente. Para o uso do isopropanol essa dependência foi menos pronunciada e as características da fase sólida exerceram uma baixa influência na retenção do soluto.

A partir dos efeitos da concentração de co-solvente e da pressão, correlações semi-empíricas foram capazes de descrever a influência da densidade da fase móvel e da concentração de modificador na constante de Henry e, por conseqüência, no fator de separação.

Definida então a condição mais promissora de enantioseparação dentro do cenário estudado, variou-se a temperatura na faixa entre 30 e 40°C e então se determinou que o processo foi entalpicamente controlado e a temperatura enantioseletiva foi definida como

58,35°C. O comportamento da retenção dos enantiômeros com a temperatura foi o previsto para a cromatografia com fluido nas proximidades do ponto crítico quando se trabalha a temperaturas próximas à temperatura ambiente.

A partir dos experimentos com solução concentrada, os modelos de isothermas de Langmuir não-competitivo, Langmuir competitivo e Langmuir competitivo com denominadores diferentes para cada enantiômero foram utilizados para descrever a adsorção do mitotano na FEQ *Kromasil CHI-TBB*. As análises mostraram que, assim como o esperado, as constantes de Henry estimadas corresponderam àquelas obtidas à diluição infinita para os enantiômeros S e R, para a mesma condição experimental, quando utilizados os modelos com competição. A proximidade entre os valores das constantes B_1 e B_2 evidenciaram que os efeitos de concentração de ambas as espécies são similares quando foi avaliada a quantidade adsorvida do enantiômero mais retido e também indicou a ausência de efeitos competitivos para o enantiômero S, menos retido, quando considerado o último modelo de isoterma de adsorção competitiva. Ainda para o último modelo estudado, a diferença alcançada nos valores dos parâmetros BB_1 e BB_2 indicou que o enantiômero R, mais retido, contribui de forma diferente na quantidade adsorvida.

Buscando otimizar o processo em batelada, o ponto ótimo para o processo em batelada utilizando fluido nas proximidades do ponto crítico em função da maximização da produtividade do processo e da minimização do consumo de solvente, foi alcançado para injeções de cerca de 0,2 mg de mitotano racêmico, recuperando-se em torno de 80% do produto desejado com até 85% de pureza.

Para finalizar, trabalhando-se com o sistema de LMS para a mesma enantioseparação, mas utilizando a FEQ *Chiralpak AD* e 40% de metanol e 60% de isopropanol como eluente, os resultados obtidos na enantioseparação indicaram que a determinação da zona de completa separação pelo procedimento aplicado não foi satisfatória, visto que a teoria do equilíbrio pode estar representando uma aproximação dos fenômenos reais envolvidos no processo, podendo apresentar desvios em relação aos valores exatos. Uma comparação entre a produtividade dos processos em batelada e em LMS e o consumo de solvente também para ambos, evidenciou a superioridade do processo contínuo.

Para trabalhos futuros, com base na avaliação qualitativa realizada da seletividade frente às variações de pressão e concentração de co-solvente sugere-se o uso de um

modelo que descreva o potencial químico do soluto na fase sólida de forma a avaliar quantitativamente o fenômeno de adsorção. Ainda, a utilização de um procedimento de otimização para determinar as variáveis de desempenho do processo em batelada pode ser recomendada visto que a busca do comportamento das variáveis de desempenho frente as de decisão, foi realizada de forma direta.

Referências Bibliográficas

- ABEL, S., MAZZOTTI, M., MORBIDELLI, M., 2002, "Solvent Gradient Operation of Simulated Moving Beds: 1. Linear isotherms", *Journal of Chromatography A*, v. 944, pp. 23-39.
- ABRAHAM, F., BAKKE, S., RUTT, A. *et al.*, 2002, "A Phase II Trial of Combination Chemotherapy and Surgical Resection for the Treatment of Metastatic Adrenocortical Carcinoma", *Cancer*, v. 94, pp. 2333-2343.
- ADRIAN, T., WENDLAND, M., HASSE, H. *et al.*, 1998, "High-pressure Multiphase Behaviour of Ternary Systems Carbon Dioxide–water–polar Solvent: Review and Modeling with the Peng–Robinson Equation of State", *Journal of Supercritical Fluid*, v. 12, pp. 185-221.
- AGRANAT, I., CANER, H., 1999, "Intellectual Property and Chirality of Drugs", *Drug Discovery Today*, v. 4, pp. 313-321.
- AHUJA, S., 1996, *Chiral Separations: Applications and Rechnology*. New York, ACS.
- AHUJA, S., 2000, *Chiral Separations by Chromatography*. New York, Oxford University Press.
- ALI, I., ABOUT-ENEIN, H. I., 2002, "Determination of Chiral Ratio of o,p-DDT and o,p'-DDD Pesticides on Polysacarides Chiral Stationary Phases by HPLC under Reversed-phase Mode", *Environment Toxicology*, v. 7, pp. 329-333.
- ANDERSEN, A., KASPERLIK-ZALUSKA, A. A., WARREN, D., 1999, "Determination of Mitotane (o,p'-DDD) and its Metabolites o,p'-DDA and o,p'-DDE in Plasma by High-performance Liquid Chromatography", *Therapeutic Drug Monitoring*, v. 21, pp. 355-401.
- ANDERSSON, S., ALLENMARK, G. S., 2002, "Preparative Chiral Chromatographic Resolution of Enantiomers in Drug Discovery", *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, v. 54, pp. 11-23.

- ANTOS, D., PIATKOWSKI, W., KACZMARSKI, K., 2000, "Determination of Mobile Phase Effect on Single-component Adsorption Isotherm by Use of Numerical Estimation", *Journal of Chromatography A*, v. 874, pp. 1-12.
- ANTOS, D., SEIDEL-MORGENSTERN, A., 2002, "Application of Gradients in the Simulated Moving Bed Process", *Chemical Engineering Science*, v. 56, pp. 6667-6682.
- ARAÚJO, M. E., MEIRELES, M. A. A., 2000, "Improving Phase Equilibrium Calculation with the Peng–Robinson EOS for Fats and Oils Related Compounds/Supercritical CO₂ Systems", *Fluid Phase Equilibria*, v. 169, pp. 49-64.
- ARAÚJO, J. M. M., RODRIGUES, R. C. R., MOTA, J. P. B., 2008, "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*, v. 1189, pp. 302-313.
- ARMSTRONG, D. W., ZUCOWSKI, J., 1994, "Direct Enantiomeric Resolution of Monoterpene Hydrocarbons via Reversed-phase High-performance Liquid Chromatography with an α -cyclodextrin Bonded Stationary Phase", *Journal of Chromatography A*, v. 666, pp. 445-448.
- ARNELL, R., FORSSÉN, P., FORNSTEDT, T., 2005, "Accurate and Rapid Estimation of Adsorption Isotherms in Liquid Chromatography Using the Inverse Method on Plateaus", *Journal of Chromatography A*, v. 1099, pp. 167–174.
- ASNIN, L., GÖTMAR, G., GUIOCHON, G., 2005, "Chromatographic Behavior of the Enantiomers of 2,2,2-trifluoro-1-(9-anthryl)ethanol on a Quinidine-carbamate Chiral Stationary Phase", *Journal of Chromatography A*, v. 1091, pp. 183–186.
- AZEVEDO, D. C. S., RODRIGUES, A. E., 1999, "Design of Simulated Moving Bed in the Presence of Mass-transfer Resistances", *AIChE Journal*, v. 45, pp. 956-966.
- BARD, Y., 1974, *Nonlinear Parameter Estimation*. New York, Academic Press.
- BARNHART, W. W., GANM, K. H., THOMAS, S., NOTARI, S. *et al.*, 2005, "Supercritical Fluid Chromatography Tandem-column Method Development in Pharmaceutical Sciences for a Mixture of Four Stereoisomers", *Journal of Separation Science*, v. 28, pp. 619-626.

- BARREIRO, E. J., FERREIRA, V. F., COSTA, P. R. R., 1997, "Substâncias Enantioméricamente Puras (sep): A Questão dos Fármacos Quirais", *Química Nova*, v. 20, pp. 647-656.
- BARRETO JR., A. G., 2005, *Projeto de Sistemas Cromatográficos para a Separação de Lapachol*. Tese de D.Sc., COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.
- BARROS, B. N., SCARMINIO, I. S., BRUNS, R. E., 1996, *Planejamento e Otimização de Experimentos*. Campinas, Editora da UNICAMP.
- BEESELEY, T. E., SCOTT, R. P. W., 1998, *Chiral Chromatography*. England, John Wiley & Sons.
- BERNAL, J. L., TORIBIO, L., DEL NOZAL, M. J. *et al.*, 2000, "Chiral Separation of Four 1,3-Dioxilane Derivatives by Supercritical Fluid Chromatography on Amylose-based Column", *Journal of Chromatography A*, v. 871, pp. 127-137.
- BERRUTI, A., TERZOLO, M., PIA, A. *et al.*, 1998, "Mitotane Associated with Etoposide, Doxorubicin and Cisplatin in the Treatment of Advanced Adrenocortical Carcinoma", *Cancer*, v. 83, pp. 2194-2200.
- BOLLEN, E., LANSER, J. B. K., 1992, "Reversible Mental Deterioration and Neurological Disturbances with o,p'-DDD therapy", *Clinical Neurology and Neurosurgery*, v. 94, p. S49-S51.
- BONATO, P. S., JABOR, V. A. P., GAITANI, C. M., 2005, "Análise enantiosseletiva de fármacos: Contribuições da cromatografia líquida de alta eficiência e eletroforese capilar", *Química Nova*, v. 28, pp. 683-691.
- BORGES DA SILVA, E. A., 2000, *Modelagem e Simulação Numérica de uma Unidade de Leito Móvel Simulado*. Dissertação de M.Sc., UFSC, Florianópolis, SC, Brasil.
- BOX, G. E. P., HUNTER, W. G., HUNTER, J. S., 1978, *Statistics for Experimenters: An Introduction to Design, Data Analysis, and Model Building*. New York, John Wiley & Sons.
- BRUNNER, G., JOHANNSEN, M., 2006, "New Aspects on Adsorption From Supercritical Fluid Phases", *The Journal of Supercritical Fluids*, v. 38, pp. 181-200.
- BUSER, H. R., MÜLLER, M. D., 1995, "Isomer-selective and Enantiomerslective Determination of DDT and Related Compounds Using Chiral High-performance Gas

- Chromatography/mass Spectrometry and Chiral High-performance Liquid Chromatography”, *Analytical Chemistry*, v. 67, pp. 2615-2698.
- CALDWELL, J., 1995, “Stereochemical Determinants of the Nature and Consequences of Drugs Metabolism”, *Journal of Chromatography*, v. 694, pp. 39-48.
- CARRILHO, E., TAVARES, M. C. H., LANÇAS, F. M., 2001, “Fluidos Supercríticos em Química Analítica I. Cromatografia com Fluido Supercrítico: Conceitos Termodinâmicos”, *Química Nova*, v. 24, pp. 509-515.
- CARRILHO, E., TAVARES, M. C. H., LANÇAS, F. M., 2006, “Fluidos Supercríticos em Química Analítica III. Cromatografia com Fluido Supercrítico: Aplicações”, *Química Nova*, v. 29, pp. 790-795.
- CARVALHO JR., A., 2010, *Separação Cromatográfica do o,p'-diclorodifenildicloroetano (mitotano) em Fase Estacionária Quiral tris-3-cloro-4-metilfenilcarbamato de Celulose e tris-3,5-dimetilfenilcarbamato de Amilose*. Dissertação de M.Sc., Campinas, SP, Brasil.
- CASS, Q. B., DEGANI, A. L. G., 2001, *Desenvolvimento de Métodos por HPLC: Fundamentos, Estratégias e Validação*. Série Apontamentos. São Carlos, Editora da UFSCar.
- CAVAZZINI, A., 2001, “Modeling of the separation of the enantiomers of 1-phenyl-1-propanol on cellulose tribenzoate”, *Analytical Chemistry*, v. 73, pp. 5704-5715.
- CAVAZZINI, A., FELINGER, A., KACZMARSKI, K. *et al.*, 2002, “Study of the Adsorption Equilibria of the Enantiomers of 1-phenyl-1-propanol on Cellulose Tribenzoate Using Microbore Column”, *Journal of Chromatography A*, v. 953, pp. 55-66.
- CAVAZZINI, A., FELINGER, A., GUIOCHON, G., 2003, “Comparison Between Adsorption Isotherm Determination Techniques and Overloaded Band Profiles on Four Batches of Monolithic Columns”, *Journal of Chromatography A*, v. 1012, pp. 139-149.
- CERUTTI, E. L., 2003, *Separação de Compostos Petroquímicos em Unidades de Leito Móvel Simulado*. Dissertação de M.Sc., UFSC, Florianópolis, SC, Brasil.
- CHARTON, F., NICOUD, R. M., 1995, “Complete Design of a Simulated Moving Bed”, *Journal of Chromatography A*, v. 702, pp. 97-112.

- CIRILLI, R., LA TORRE, F., 1998, "Stereoselective Analysis of Benazepril and its Stereoisomers by Reversed-phase High-performance Liquid Chromatography on a Chiral AGP Column", *Journal of Chromatography A*, v. 818, pp. 53-60.
- CIRILLI, R., DEL GIUDICE, M. R., FERRETTI, R. *et al.*, 2001, "Conformational and Temperature Effects on Separation of Stereoisomers of a C3, C4-substituted β -lactamic Cholesterol Absorption Inhibitor on Amylose-based Chiral Stationary Phases", *Journal of Chromatography A*, v. 923, pp. 27-36.
- COELHO, F. A S., 2001, "Fármacos e Quiralidade", *Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola*, v. 3, pp. 23-32.
- COLLINS C. H., BRAGA, G. L., BONATO, P. S., 2006, *Fundamentos de cromatografia*. Campinas, Editora da Unicamp.
- COSTA JR., E. F., LAGE, P. L. C., BISCAIA JR., E. C., 2003, "On the Numerical Solution and Optimization of Styrene Polymerization in Tubular Reactors", *Computers and chemical Engineering*, v.27, pp. 1591-1604.
- COX, G. B., 2005, *Preparative Enantioselective Chromatography*. Oxford, Blackwell Publishing.
- DALGLIESH, C. E. J., 1952, "The Optical Resolution of Aromatic Amino-acids on Paper Chromatograms", *Journal of Chemical Society*, pp. 3940-3942.
- DE LEÓN, D. D., LANGE, B. J., WALTERHOUSE, D. *et al.*, 2002, "Long-term (15 years) Outcome in an Infant with Metastatic Adrenocortical Carcinoma", *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, v. 87, pp. 4452-4456.
- DENET, F., HAUCK, W., NICLOUD, R.M. *et al.*, 2001, "Enantioseparation through Supercritical Fluid Simulated Moving Bed (SF-SMB) Chromatography", *Industrial and Engineering Chemistry Research*, v. 40, pp. 4603-4609.
- DEPTA, A., GIESE, T., JOHANSEN, M. *et al.*, 1999, "Separation of Stereoisomers in a Simulated Moving Bed-supercritical Fluid Chromatography Plant", *Journal of Chromatography A*, v. 865, pp. 175-186.
- DI GIOVANNI, O., 2000, *Preparative Chromatography Using Supercritical Fluids*. Ph.D. dissertation, Swiss Federal Institute of Technology Zurich, Zurich, Switzerland.

- DI GIOVANNI, O., MAZZOTTI, M., MORBIDELLI, M. *et al.*, 2001, "Supercritical Fluid Simulated Moving Bed Chromatography II. Langmuir Isotherm", *Journal of Chromatography A*, v. 919, pp. 1-12.
- DIAS, R. M., 2007, *Separação Cromatográfica Quiral do o,p'-diclorodifenildicloroetano (mitotano) em Fase Estacionária Quiral o,o'-bis[4-terc-butilbenzoi]l-n,n'-dialil-l-tartadiamida*. Dissertação de M.Sc., UNICAMP, Campinas, SP, Brasil.
- DICKSTEIN, G., SHECHNER, C., ARAD, E. *et al.*, 1998, "Is There a Role for Low Doses of Mitotane (o,p'-DDD) as Adjuvant Therapy in Adrenocortical Carcinoma", *Journal of Clinical Endocrinology Metabolism*, v. 83, pp. 3100-3103.
- DING, G., LIU, Y., CONG, R. Z. *et al.*, 2004, "Chiral Separation of Enantiomers of Amino acid Derivatives by High-performance Liquid Chromatography on a Norvancomycin-bonded Chiral Stationary Phase", *Talanta*, v. 62, pp. 997-1003.
- DOBBS, J. M., WONG, J. M., LAHIERE, R. J. *et al.*, 1987, "Modification of Supercritical Fluid Phase Behavior Using Polar Cosolvents", *Industrial & Engineering Chemistry Research*, v. 26, pp. 56-65.
- DUAN, G., CHING, C. B., SWARUP, S., 1998, "Kinetic and Equilibrium Study of the Separation of Propranolol Enantiomers by High Performance Liquid Chromatography on a Chiral Adsorbent", *Chemical Engineering Journal*, v. 69, pp. 111-117.
- EBERHART, R., KENNEDY, J., 1995, "Particle Swarm Optimization", *International Conference On Neural Networks, IV*, Piscataway, NJ, pp. 1942-1948.
- EBERHART, R.C., SHI, Y., 2001, "Particle Swarm Optimization: Development, Applications and Resources", *Proceedings of Congress on Evolutionary Computation*, Seoul, Korea, pp.81-86.
- EUROPEAN MEDICINE AGENCY. Disponível em: <http://www.emea.europa.eu/>. Acesso em: 19 ago. 2008, 14:00.
- FAVARETO, R., PEREIRA, J. R. D., SANTANA, C. C. *et al.*, 2009, "High Pressure Phase Diagram of the Drug Mitotane in Compressed and/or Supercritical CO₂", *Journal of Chemical Thermodynamics*, v. 42, pp. 286-290.
- FELINGER, A., CAVAZZINI, A., GUIOCHON, G., 2003, "Numerical Determination of the Competitive Isotherm of Enantiomers", *Journal of Chromatography A*, v. 986, pp. 207-225.

- FORNSTEDT, T., SAJONZ, P., GUIOCHON, G., 1997, "Thermodynamic Study of an Unusual Chiral Separation: Propranolol Enantiomers on an Immobilized Cellulase", *Journal of the American Chemical Society*, v. 119, pp. 1254-1264.
- FÓRSEN, P., FORNSTEDT, T., 2006, "General Theory of Indirect Detection in Chromatography", *Journal of Chromatography A*, v.1126, pp. 268-275.
- FRANCOTTE, E. R., JUNKER-BUCHHEIT, A., 1992, "Preparative Chromatography Separation of Enantiomers", *Journal of Chromatography - Biomedical Application*, v. 576, pp. 1-45.
- FRANCOTTE, E. R., 1994, "Contribution of Preparative Chromatographic Resolution to the Investigation of Chiral Phenomena", *Journal of Chromatography*, v. 666, pp. 565-601.
- FRANCOTTE, E. R., RICHERT, P., 1997, "Applications of Simulated Moving-bed Chromatography to the Separation of the Enantiomers of Chiral drugs", *Journal of Chromatography A*, v. 769, pp. 101-107.
- FRANCOTTE, E. R., 2001, "Enantioselective Chromatography as a Powerful Alternative for the Preparation of Drug Enantiomers", *Journal of Chromatography A*, v. 906, pp. 379-397.
- GITTERMAN, M., PROCACCIA, I., 1983, "Quantitative Theory of Solubility in Supercritical Fluids", *The Journal of Chemical Physics*, v. 78, pp. 2648-2654.
- GOLSHAN-SHIRAZI, S., GUIOCHON, G., 1988, "Comparison Between Experimental and Theoretical Band Profiles in Nonlinear Liquid Chromatography with a Binary Mobile Phase", *Analytical Chemistry*, v. 60, pp. 2641.
- GRILL, M., MILLER, L., YAN, T. Q., 2004, "Resolution of a Racemic Pharmaceutical Intermediate: A Comparison of Preparative HPLC, Steady State Recycling and Simulated Moving Bed", *Journal of Chromatography A*, v. 1026, p. 101-108.
- GRITTI, F., GUIOCHON, G., 2003, "New Thermodynamically Consistent Competitive Adsorption Isotherm in RPLC", *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 264, pp. 43-59.
- GRITTI, F., GUIOCHON, G., 2004, "Effect of the Ionic Strength of Salts on Retention and Overloading Behavior of Ionizable Compounds in Reversedphase Liquid Chromatography", *Journal of Chromatography A*, v. 1033, pp. 43.

- GROSFILS, V., 2009, *Modelling na parametric estimation of simulated moving be chromatographic processes (SMB)*. Tese de D.Sc., Université Libre de Bruxelles, Bélgica.
- GUBITZ, G., SCHMID, M. G., 2006, "Chiral Separation Principles in Chromatographic and Eletromigration Techniques", *Molecular Biotechnology*, v. 2, pp. 159-179.
- GUIOCHON, G., 2002, "Preparative Liquid Chromatography", *Journal of Chromatography A*, v. 965, pp. 129-161.
- GUIOCHON, G., LIN, B., 2003, *Modeling for Preparative Chromatography*. California, Academic Press.
- GUIOCHON, G., SHIRAZI, S. G., KATTI, A. M., 1994, *Fundamentals of Preparative and Nonlinear Chomatography*. Boston, Academic Press.
- HAAG, J., WOUWER, V., LEHOUCQ, S. *et al.*, 2001, "Modeling and Simulation of a SMB Chromatographic Process Designed for Enantioseparation", *Control Engineering Practice*, v. 9, pp. 921-928.
- HAAK, H. R., HERMANS, J., VAN DE VELDE, C. J. H. *et al.*, 1994, "Optimal Treatment of Adrenocortical Carcinoma with Mitotane: Results in a Consecutive Series of 96 Patientes", *British Journal of Cancer*, v. 69, pp. 947-951.
- HENDERSON, G. M., RULE, H. G., 1939, "A New Method of Resolving a Racemic Compound", *Nature*, v. 142, pp. 1568-1573.
- HENRY, M. C., YONKER, C. R., 2006, "Supercritical Fluid Chromatography, Pressurized Liquid Extraction and Supercritical Fluid Extraction", *Analytical Chemistry*, v. 78, pp. 3909-3915.
- HOUWING, J., JENSEN, T. B., VAN HATEREN, S. H. *et al.*, 2003, "Position of Salt Gradients in Ion-exchange", *AIChE Journal*, v. 49, pp. 665-674.
- HUTCHISON, T. A., SHAHAN, D. R., 2004, *DRUGDEX System, Electronic Version*. Colorado: Inc.Greenwood Village.
- JACOBSON, J., FRENZ, J., HORVÁTH, C., 1984, "Measurement of Adsorption Isotherms by Liquid Chromatography", *Journal of Chromatography A*, v. 316, pp. 53-68.

- JAMES, F., SEPÚLVEDA, M., CHARTON, F. *et al.*, 1999, "Determination of Binary Competitive Equilibrium Isotherms from the Individual Chromatographic Band Profiles", *Chemical Engineering Science*, v. 54, pp. 1677-1696.
- JENSEN, T. B., REIJNS, T.G. P., BILLIET, H.A.H. *et al.*, 2000, "Novel Simulated Moving-bed Method for Reduced Solvent Consumption", *Journal of Chromatography A*, v. 873, pp. 149.
- JHA, S. K., MADRAS, G., 2005, "Correlations for Binary Phase Equilibria in High-pressure Carbon Dioxide", *Fluid Phase Equilibria*, v. 238, pp. 174-179.
- JOHANSSON, M., 2001, "Separation of Enantiomers of Ibuprofen on Chiral Stationary Phases by Packed Column Supercritical Fluid Chromatography", *Journal of Chromatography A*, v. 937, pp. 135-138.
- JUSFORGUES, P., SHAIMI, M., 1998, "Preparative Supercritical Fluid Chromatography", *Analisis Magazine*, v. 26, pp. 55-60.
- JUZA, M., MAZZOTTI, M., MORBIDELLI, M., 2000, "Simulated Moving-bed Chromatography And its Application to Chirotechnology", *TIB Tech*, v. 18, pp. 108-118.
- KALIL, S. J., MAUGERI, F., RODRIGUES, M. I., 2000, "Response Surface Analysis and Simulation as a Tool for Bioprocess Design and Optimization", *Process Biochemistry*, v. 35, pp. 539-550.
- KASPERLIK-ZALUSKA, A. A., MIGDALSKA, B. M., ZGLICZYNSKI, S. *et al.*, 1995, "Adrenocortical Carcinoma: a Clinical Study and Treatment Results of 52 Patients", *Cancer*, v. 75, pp. 2587-2591.
- KASPERLIK-ZALUSKA, A. A., 2000, "Clinical Results of the Use of Mitotane for Adrenocortical Carcinoma", *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 33, pp. 1191-1196.
- KENNEDY, J. H., BELVO, M. D., WILLIAMS, J. D., 2004, "Comparison of Separation Efficiency of Early Phase Active Pharmaceutical Intermediates by Steady State Recycle and Batch Chromatographic Techniques", *Journal of Chromatography A*, v. 1046, pp. 55-60.
- KHALIL, W., COQUELET, C., RICHON, D., 2007, "High-pressure Vapor-liquid Equilibria, Liquid Densities and Excess Molar Volumes for the Carbon Dioxide + 2-propanol

- System from (308.10 to 348.00) K”, *Journal of Chemical & Engineering Data*, v. 52, pp. 2032-2040.
- KHURI, A. I., CORNELL, J. A., 1987, *Response Surface Design and Analysis*. New York, Marcel Dekker Inc.
- KLESPIER, E., CORWIN, A. H., TURNER, D. A., 1962, “High Pressure Gas Chromatography above Critical Temperatures”, *Journal of Organic Chemistry*, v. 27, pp. 700-701.
- KOPF, D., GORETZKI, P. E., HENDRIK, L., 2001, “Clinical Management of Malignant Adrenal Tumors”, *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, v. 127, pp. 143-455.
- KOZMA, D., 2002, *CRC Handbook of Optical Resolutions via Diastereomeric Salt Formation*. Boca Raton, CRC Press.
- KÜSTERS, E., SPÖNDLIN, C., 1996, “Influence of Temperature on the Enantioseparation of Rolipram and Structurally Related Racemates on Chiralcel-OD”, *Journal of Chromatography A*, v. 737, pp. 333-337.
- LEE, M. L., MARKIDES, K. E., 1990, *Analytical Supercritical Fluid Chromatography and Extraction*. In: Chromatography Conferences, Utah, USA.
- LEE, W. C., TSAI, G. J., TSAO, G., 1993, “Analysis of Chromatography by Plate Theory”, *Separation Technology*, v. 3, pp. 178-197.
- LIM, M. C., TAN, Y. O., CHONG, P. Y. *et al.*, 1990, “Treatment of Adrenal Carcinoma with Mitotane: Outcome and Complications”, *Annals of the Academy of Medicine Singapore*, v. 19, pp. 540-544.
- LIMA, V. L. E., 2007, “Os Farmacos e a Quiralidade: Uma Breve Abordagem”, *Quimica Nova*, v. 20, pp. 657-663.
- LINDHOLM, J., FORNSTEDT, T., 2005, “Investigation of the Adsorption Behaviour of a Chiral Model Compound on a Tartardiamide-based Network-polymeric Chiral Stationary Phase”, *Journal of Chromatography A*, v. 1095, pp. 50-59.
- LÜBBERT, M., BRUNNER, G., JOHANNSEN, M., 2007, “Adsorption Equilibria of α - and δ -tocopherol from Supercritical Mixtures of Carbon Dioxide and 2-propanol onto Silica by Means of Perturbation Chromatography”, *Journal of Supercritical Fluids*, v. 42, pp. 180-188.

- MACHERY-NAGEL, 2000, *Guia para Colunas Cromatográficas*, pp. 62-66.
- MAZZOTTI, M., STORTI, G., MORBIDELLI, M., 1994, "Shock Layer Analysis in Multicomponent Chromatography and Countercurrent Adsorption", *Chemical Engineering Science*, v. 49, pp.1337-1355.
- MAZZOTTI, M., BACIOCCHI, R., STORTI, G. *et al.*, 1996, "Vapor-phase SMB Adsorptive Separation of Linear/nonlinear Paraffins", *Industrial and Engineering Chemistry Research*, v. 35, pp. 2313-2321.
- MAZZOTTI, M., STORTI, G., MORBIDELLI, M., 1997, "Supercritical Fluid Simulated Moving Bed Chromatography", *Journal of Chromatography A*, v. 786, pp. 309-320.
- MAO, Q. M., PRINCE, I. G., HEARN, M. T. W., 1993, "High-performance Liquid Chromatography of Amino Acids, Peptides and Proteins CXXXII. Optimization of Operating Parameters for Protein Purification with Chromatographic Columns", *Journal of Chromatography*, v. 646, pp. 81-89.
- MENDONÇA, L. F., LOPES, V. L. R., 2004, "Uma Análise Comparativa do Desempenho de Métodos Quase-Newton na Resolução de Problemas em Sísmica", *Tendências em Matemática Aplicada e Computacional*, v. 5, pp. 107-116.
- METAHEURISTICS NETWORK. Disponível em: <http://www.metaheuristics.net>. Acesso em: 14 jan. 2011, 20:30.
- MIGLIORINI, C., WENDLINGER, M., MAZZOTTI, M. *et al.*, 2001, "Temperature Gradient Operation of a Simulated moving Bed Unit", *Industrial Engineering and Chemical Research*, v. 40, 2606-2617.
- MIHLBACHLER, K., KACZMARSKI, K., SEIDEL-MORGENSTERN, A. *et al.*, 2002, "Measurement and Modeling of the Equilibrium Behavior of the Träger's Base Enantiomers on an Amylose-based Chiral Stationary Phase", *Journal of Chromatography A*, 955, pp. 35-52.
- MILLER, L., POTTER, M., 2008, "Preparative Chromatographic Resolution of Racemates Using HPLC and SFC in a Pharmaceutical Discovery Environment", *Journal of Chromatography B*, v. 1, pp. 230-236.
- MIYABE, K., SUZUKI, M., 1992, "Chromatography of Liquid-phase Adsorption on Octadecylsilyl-silica Gel", *AIChE Journal*, v. 38, pp. 901-910.

- MIYABE, K., GUIOCHON, G., 1999, "Kinetic study of the mass transfer of S-Tröger base in the system cellulose triacetate and ethanol", *Journal of Chromatography A*, v. 849, pp. 445-465.
- MIYABE, K., GUIOCHON, G., 2000, "A kinetic study of mass transfer in reversed-phase liquid chromatography on C18-silica gel", *Analytical Chemistry*, v. 72, pp. 5162-5171.
- MOURIER, P. A., ELIOT, E., CAUDE, M. H. *et al.*, 1985, "Supercritical and subcritical fluid chromatography on a chiral stationary phase for the resolution of phosphine oxide enantiomers", *Analytical Chemistry*, v. 57, pp. 2819-2823.
- NEGAWA, M., SHOJI, F., 1992, "Optical resolution by simulated moving-bed adsorption technology", *Journal of Chromatography*, v. 590, pp.113-117.
- NICOLA, G. D., PACETTI, M., POLONARA, F. *et al.*, 2008, "Development and optimization of a method for analyzing biodiesel mixtures with non-aqueous reversed phase liquid chromatography", *Journal of Chromatography A*, v. 1190, pp.120-126.
- NICOUD, R. M., SEIDEL-MORGENSTERN, A., 1996, "Adsorption isotherms: Experimental determination and application to preparative chromatography", *Isolation and Purification*, v. 2, pp. 165-200.
- NICOUD, R. M., 1999, "The Separation of Optical Isomers by Simulated Moving Bed Chromatography (Part I)", *Pharmaceutical Technology Europe*, v. 11, pp. 36-45.
- ORLANDO, R. M., FILHO, N. C., GIL, E. S. *et al.*, 2007, "Importância Farmacêutica de Fármacos Quirais", *Revista Eletrônica de Farmácia*, v. IV, pp. 8-14.
- PAIS, L. S., LOUREIRO, J. M., RODRIGUES, A. E., 1997, "Separation of 1,1-bi-naphthol Enantiomers by Continous Chromatography in Simulated Moving Bed", *Chemical Engineering Science*, v. 52, pp. 245-257.
- PAIS, L. S., LOUREIRO, J. M., RODRIGUES, A. E., 1998, "Separation of Enantiomers of a Chiral Epoxide by Simulated Moving Bed Chromatography", *Journal of Chromatography A*, v. 827, pp. 215-233.
- PAIS, L. S., RODRIGUES, A. E., 2003, "Design of Simulated Moving Bed and Varicol Processes for Preparative Separations with a Low Number of Columns", *Journal of Chromatography A*, v. 1006, pp. 33-44.
- PAIVA, A. P., 2006, "O fenômeno da Quiralidade". *Boletim da Sociedade Portuguesa de Química*, v. 103, pp. 56-61.

- PAPADOPOULOU-MOURKIDOU, E., 1989. Effect of Column Temperature on the Direct Determination of (RS)-alpha-cyano(3-phenoxyphenyl)methyl (RS)-2-(4-chlorophenyl)-3-methylbutyrate Optical Isomers by High-performance Liquid Chromatography/diode Array System. *Analytical Chemistry*, v. 61, pp. 1149-1151.
- PARK, J. H., LEE, J. W., KWON, S. H. *et al.*, 2004, "Separation of Racemic 2,4-Dinitrophenyl Amino Acids on 9-O-(phenyloxycarbonyl)quininebonded Carbon-clad Zirconia in Reversed-phase Liquid Chromatography", *Journal of Chromatography A*, v. 1050, pp. 151-157.
- PEPER, S., JOHANNSEN, M., BRUNNER, G., 2007, "Preparative Chromatography with Supercritical Fluids: Comparison of Simulated Moving Bed and Batch Processes", *Journal of Chromatography A*, v. 1176, pp. 246-253.
- PERRUT, M., 1994, "Advances in Supercritical Fluid Chromatographic Processes", *Journal of Chromatography A*, v. 658, pp. 293-313.
- PETZOLD, L. R., "DASSL Code, Version 1989", Computing and Mathematics Research Division, Lawrence Livermore National Laboratory, L136, PO Box 808, Livermore, CA 94559, 1989.
- PIANOVSKI, M. A. D., MALUF, E. M. C. P., CARVALHO, D. S. *et al.*, 2006, "Mortality Rate of Adrenocortical Tumors in Children Under 15 Years of Age in Curitiba, Brazil", *Pediatric Blood Cancer*, v. 47, pp. 56-60.
- PINTO, J. C., 1990, "Sequential Experimental Design for Parameter Estimation: a Different Approach", *Chemical Engineering Science*, v. 45, pp. 883-892.
- PIRKLE, W. H., FINN, J. M., 1981, "Chiral High-Pressure Liquid Chromatographic Stationary Phases. 3. General Resolution of Arylalkylcarbinols", *Journal of Organic Chemistry*, v. 46, pp. 2935-2938.
- PIRKLE, W. H. (1991). Unusual Effect of Temperature on the Retention of Enantiomers on a Chiral Column. *Journal of Chromatography A*, v. 558, pp. 1-6.
- PRYDE, A. In: *Chiral Liquid Chromatography*, Lough, W. J., Glasgow: Ed. Blackie, 1989.
- RAJENDRAN, A., MAZZOTTI, M., MORBIDELLI, M., 2005a, "Enantioseparation of 1-Phenyl-1-propanol on Chiralcel OD by Supercritical Fluid Chromatography I. Linear Isotherm", *Journal of Chromatography A*, v. 1076, pp. 183-188.

- RAJENDRAN, A., KRÄUCHI, O., MAZZOTTI, M. *et al.*, 2005b, "Effect of Pressure drop on Solute Retention and Column Efficiency in Supercritical Fluid Chromatography", *Journal of Chromatography A*, v. 1092, pp. 149-160.
- RAJENDRAN, A., 2006, *Adsorption and Chromatography Under Supercritical Conditions*. Ph. D. dissertation, Swiss Federal Institute of Technology Zurich, Zurich, Switzerland.
- RAJENDRAN, A., PAREDES, G., MAZZOTTI, M., 2009, "Simulated Moving Bed Chromatography for the Separation of Enantiomers", *Journal of Chromatography A*, v. 1216, pp. 709-738.
- RAMÍREZ, P., GARCIA-RISCO, M. R., SANTOYO, S. *et al.*, 2006, "Isolation of Functional Ingredients from Rosemary by Preparative Supercritical fluid Chromatography (Pre-SFC)", *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 41, pp. 1606-1613.
- RHEE, H. K., ARUIS, R., AMUNDSON, N. R. *et al.*, 1989, "Optimal design of countercurrent adsorption separation processes involving non-linear equilibria", *Chemical Engineering Science*, v. 44, pp. 1329-1345
- RIBEIRO, R. C., MICHALKIEWICZ, E. L., FIGUEIREDO, B. C. *et al.*, 2000, "Adrenocortical tumors in children", *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 33, pp. 1225-1234.
- RIBEIRO A. E, GRAÇA, N., PAIS, L. *et al.*, 2008, "Preparative Separation of Ketoprofen Enantiomers: Choice of Mobile Phase Composition and Measurement of Competitive Adsorption Isotherms", *Separation and Purification Technology*, v. 61, pp. 375-383.
- RODRIGUES, A. E., PAIS, L. S., 2004, "Design of SMB chiral separations using the concept of separation volume", *Separation Science and Technology*, v. 39, pp. 245-270.
- ROJKOVIÈOVÁ, T., LEHOTAY, J., KRUPÈIK, A. *et al.*, 2004, "Study of the mechanism of enantioseparation. VII. Effect of temperature on retention of some enantiomers of phenylcarbamic acid derivatives on a teicoplanin aglycone chiral stationary phase", *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, v. 27, pp. 1653-1670.
- ROMERO, J. R., 1998, *Fundamentos de Estereoquímica dos Compostos Orgânicos*. Ribeirão Preto, Ed. Holos.

- ROSA, P. C. P., 2005, *Estudo da separação cromatográfica dos enantiômeros do omeprazol em fase estacionária quiral Kromasil CHI-TBB (O,O`-bis[4-terc-butilbenzoil]-N,N`-dialil-L-tartadïamida)*. Dissertação de M.Sc., UNICAMP, Campinas, SP, Brasil.
- ROTH, M., 2004, "Determination of thermodynamic properties by supercritical fluid chromatography", *Journal of Chromatography A*, v. 1037, pp. 369-391.
- RUTHVEN, D. M., 1984, *Principles of Adsorption and Adsorption Process*. New York, John Wiley & Sons.
- RUTHVEN, D. M., CHING, C. B., 1989, "Counter-current and Simulated Counter-current Adsorption Separation Processes", *Chemical Engineering Science*, v. 44, pp. 1011-1038.
- SANDLER, 1999. Disponível em: <http://www.che.udel.edu/thermo/mathcadwork.htm>. Acesso em: 18 set. 2009, 15:30.
- SANTANA, C. C., AZEVEDO, D. C. S., RODRIGUES, A. E., "Processo Cromatográfico Contínuo". In: Kilikian, B. V., Pessoa Jr., A., *Purificação de Produtos Biotecnológicos*, capítulo 15, São Paulo, BR, Ed. Manole, 2005.
- SARTOR, J. P., 2006, *Separação Cromatográfica do Fármaco Rolipram Utilizando Fase Estacionária o,o`-bis[4-terc-butilbenzoil]-n,n`-dialil-l-tartadïamida*. Dissertação de M.Sc., UNICAMP, Campinas, SP, Brasil.
- SCHLAUCH, M., FRAHM, A. W., 2001, "A Thermodynamic Study of the Temperature Dependent Elution Order of Cyclic α -amio Acid Enantiomers on a Copper(II)-D-penicillamine chiral stationary phase", *Analytical Chemistry*, 73, pp. 262-266.
- SCHMIDT-TRAUB, H., 2005, *Preparative Chromatography*. Weinheim, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KgaA.
- SCHRAMN, H., KASPEREIT, M., KIENLE, A. *et al.*, 2003, "Simulated Moving Bed Process with Cyclic Modulation of the Feed Concentration", *Journal of Chromatography A*, v. 1006, pp. 77-86.
- SCHÜLER-FACCINI, L., LEITE, J. C. L., SANSEVERINO, M. T. V. *et al.*, 2002, "Avaliação de Teratógenos na População Brasileira", *Ciência e Saúde Coletiva*, v. 7, pp. 65-71.
- SCHULICK, R. D., BRENNAN, M. F., 1999, "Long-term Survival After Complete Resection and Repeat Resection in Patients with Adrenocortical Carcinoma", *Annals of Surgical Oncology*, v. 8, pp. 719-726.

- SCHULTE, M., STRUBE, J., 2001, "Preparative Enantioseparation by Simulated Moving Bed Chromatography", *Journal of Chromatography A*, v. 906, pp. 399-416.
- SCHULTE, M., EPPING, A., 2005, *Preparative Chromatography of Fine and Pharmaceuticals Agents*. Weinheim, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- SCHURIG, V., 1994, "Enantiomer Separation by Gas Chromatography on Chiral Stationary Phases", *Journal of Chromatography A*, v. 666, pp. 111-129.
- SCHWAAB, M., 2007, *Desenvolvimento e Implementação de Novas Técnicas de Estimação de Parâmetros e Planejamento Sequencial de Experimentos*. Tese de D.Sc., COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.
- SEIDEL-MORGENSTERN, A., 1998, "Optimization and Comparison of Different Modes of Preparative Chromatography", *Analisis Magazine*, v. 26, pp. M46-M55.
- SEIDEL-MORGENSTERN, A., 2004, "Experimental Determination of Single Solute and Competitive Adsorption Isotherms", *Journal of Chromatography A*, v. 1037, pp. 255-272.
- SEWELL, P. A., CLARKE, B., 1987, *Chromatography Separation*. Chicester, John Wiley & Sons.
- SHIMIZU, T. *Pesquisa Operacional em Engenharia, Economia e Administração: Modelos Básicos e Modelos Computacionais*. Rio de Janeiro: Guanabara Dois, 1984.
- SIE, S. T., RIJNDERS, G. W. A., 1967, "Chromatography with Supercritical Fluids", *Analytica Chimica Acta*, v. 38, pp. 31-44.
- SILVA JR., I. J., VEREDAS, V., SANTOS, M. A. G., 2006, "Cromatografia em Leito Móvel Simulado na Produção de Substâncias Enantiomericamente Puras ou Enriquecidas em Larga Escala", *Química Nova*, v. 29, pp. 1027-1037.
- SINGH, A. K., HEDOR-HACKMANN, E. R. M., SANTORO, M. I. R. M., 2006, "Cromatografia Líquida com Fase Quiral Aplicada na Separação Enantiomérica de Fármacos Cardiovasculares", *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 42, pp. 553-566.
- SMITH, R. M., 1988, *Supercritical Fluid Chromatography*. Cambridge, The Royal Society of Chemistry.

- SMITH, R. J., TAYLOR, D. R., WILKINS, S. M., 1995, "Temperature Dependence of Chiral Discrimination in Supercritical fluid Chromatography and High-performance Liquid Chromatography", *Journal of Chromatography A*, v. 697, pp. 591-596.
- SNYDER, L. R., KIRLAND, J. J., 1979, *Introduction to Modern Liquid Chromatography*. New York, John Wiley & Sons.
- STORTI, G., MAZZOTTI, M., MORBIDELLI, M. *et al.*, 1993, "Robust Design of Binary Countercurrent Adsorption Separation Processes", *AIChE Journal*, v. 39, pp. 471-492.
- STORTI, G., BACIOCCHI, R., MAZZOTTI, M. *et al.*, 1995, "Design of Optimal Operating Conditions of Simulated Moving Bed Adsorptive Separation Units", *Industrial and Engineering Chemistry Research*, v. 34, pp. 288-301.
- STRINGHAM, R. W. (1996). Relationship Between Resolution and Analysis Time in Chiral Subcritical Fluid Chromatography. *Chirality*, v. 8, pp. 249-257.
- SU, B., BAO, Z., XING, H. *et al.*. (2009). Enantioseparation of Paroxetine Intermediate on an Amylase-derived Chiral Stationary Phase by Supercritical Fluid Chromatography. *Journal of Chromatography A*, v. 1216, pp. 5140-5146.
- SUBRAMANIAN, G., 2007, *Chiral Separation Techniques: A Practical Approach*. Weinheim, Wiley-VCH Verlag GmbH.
- SUCUPIRA, I. R., 2004, *Métodos Heurísticos Genéricos: Meta-Heurísticas e Hiper-Heurísticas*. Dissertação de M.Sc., IME, São Paulo, SP, Brasil.
- SUNOL, A. K., GÖNENÇ, Z. S., AKMAN, U., 1996, "Analysis of Retention in Supercritical Fluid Chromatography and its Relation to Solubility", *Turkish Journal of Chemistry*, v. 20, pp. 9-26.
- TACHIBANA, K., OHNISHI, A., 2001, "Reversed-phase Liquid Chromatographic Separation of Enantiomers on Polysaccharide Type Chiral Stationary Phases", *Journal of Chromatography A*, v. 906, pp. 127-154.
- TERFLOTH, G., 2001, "Enantioseparation in Super and Subcritical Fluid Chromatography", *Journal of Chromatography A*, v. 906, pp. 301-307.
- TERZOLO, M., PIA, A., BERRUTI, A. *et al.*, 2000, "Low-dose Monitored Mitotane Treatment Achieves the Therapeutic Range with Managable Side Effects in Patientes

- with Adrenocortical Cancer”, *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, v. 85, pp. 2234-2238.
- TORIBIO, L., BERNAL, J. L., DEL NOZAL, M. J. *et al.*, 2001, “Applications of the Chiralpak AD and Chiralcel OD Chiral Columns in the Enantiomeric Separation of Several Dioxolane Compounds by Supercritical Fluid Chromatography”, *Journal of Chromatography A*, v. 921, pp. 305-313.
- TORIBIO, L., DEL NOZAL, M. J., BERNAL, J. L. *et al.*, 2004, “Chiral Separation of Some Triazole Pesticides by supercritical Fluid Chromatography”. *Journal of Chromatography A*, v. 1046, pp. 249-253
- TORIBIO, L., DEL NOZAL, M. J., BERNAL, J. L. *et al.*, 2005, “Comparative Study of the Enantioselective Separation of Several Antiulcer Drugs by High-performance Liquid and Supercritical Fluid Chromatography”. *Journal of Chromatography A*, v. 1091, pp. 118-123.
- TORIBIO, L., ALONSO, C., DEL NOZAL, M. J. *et al.*, 2006, “Semipreparative Enantiomeric Separation of Omeprazole by Supercritical Fluid Chromatography”. *Journal of Chromatography A*, v. 1137, pp. 30-35.
- TROTTA, M., GALLARTE, M., PATTARINO, F., *et al.*, 2001, “Emulsions Containing Partially Water-miscible Solvents for the Preparation of Drug Nanosuspensions”. *Journal of Controlled Release*, v. 76, pp. 119-128.
- VAN BUREN, J. M., BERGENSTAL, D. M., 1960, “An Evaluation of Graded Hypophysectomy in Man: A Quantitative Functional and Anatomical Study”. *Cancer*, v. 13, pp. 155-171.
- VAN SLOOTEN, H., MOOLENAAR, A. J, VAN SETERS, A. P. *et al.*, 1984, “The Treatment of Adrenocortical Carcinoma with o,p'DDD: Prognostic Implications of Serum Level Monitoring”. *European Journal of Clinical Oncology*, v. 20, pp. 47-53.
- VAN WASEN, U., SCHNEIDER, G. M., 1975, “Pressure and Density Dependence of Capacity Ratios in Supercritical Fluid Chromatography (SFC) with Carbon Dioxide as Mobile Phase “. *Chromatographia*, v. 8, pp. 274-276.
- VIEIRA, R. C., BISCAIA JR. E. C., 2000, “An Overview of Initialization Approaches for Differential-algebraic Equations”. *European Journal of Clinical Oncology*, v. 20, pp. 47-53.

- VIJAYARAGHAVAN , K., PADMESH, T. V. N., PALANIVELU, K. *et al.*, 2006, "Biosorption of Nickel (II) Ion Sonto Sargassum Wightii: Application of Two-parameter and Three-Parameter Isotherm Models". *Journal of Hazardous Materials*, v. B133, pp. 304-308.
- WANG, X, CHING, C. B., 2002, "Kinetic and Equilibrium Study of the Separation of Three Chiral Center Drug, Nadolol, by HPLC on a Novel Perphenyl Carbamoylated β -Cyclodextrin Bonded Chiral Stationary Phase". *Separation Science Technology*, v. 37, pp. 2567-2586.
- WANG, T., WENSLOW JR., R. M., 2003, "Effects of Alcohol Mobile-phase Modifiers on the Structure and Chiral Selectivity of Amylose Tris(3,5-dimethylphenylcarbamate) Chiral Stationary Phase". *Journal of Chromatography A*, v. 1015, pp. 99-110.
- WELCH, C. J., FLEITZ, F., ANTIA, F. *et al.*, 2004, "Chromatography as an Enabling Technology in Pharmaceutical Process Development: Expedited Multikilogram Preparation of a Candidate HIV Protease Inhibitor". *Organic Process Research & Development*, v. 8, pp. 186-191.
- WENDA, C., RAJENDRAN, A., 2009, "Enantioseparation of Flubiprofen on Amylase-Derived by Superchiral Stationary Phase by Supercritical Fluid Chromatography I. Linear Isotherm". *Journal of Chromatography A*, v. 1216, pp. 8750-8758.
- WENDA, C., HAGNPANAH, R., RAJENDRAN, A. *et al.*, 2011, "Optimization of Isocratic Supercritical Fluid Chromatography for Enantiomer Separation". *Journal of Chromatography A*, v. 1218, pp. 162-170.
- WENG, W., WANG, Q. H., YAO, B. X. *et al.*, 2004, "Enantioseparation of Amino Acid Derivatives on an Immobilized Network Polymer Derived from L-tartaric Acid". *Journal of Chromatography A*, v. 1042, pp. 81-87.
- WENG, W., ZENG, Q., YAO, B. *et al.*, 2005, "Influence of Mobile Phase Composition on the Apparent Thermodynamic Characteristics in Liquid Chromatography Enantioseparation on a Tartdiamide-based Stationary Phase". *Chromatographia*, v. 61, pp. 561-566.
- WHATLEY, J., 1995, "Enantiomeric Separation by Packed Column Chiral Supercritical Fluid Chromatography". *Latin American Applied Research*, v. 30, pp. 303-313.

- WILLIAMS, K. L., SANDER, L. C., 1997, "Enantiomer Separation on Chiral Stationary Phases in Supercritical Fluid chromatography". *Journal of Chromatography A*, v. 785, pp. 149-158.
- WITTE, D. T., FRANKE, J. P., BRUGGEMANN, F. J. *et al.*, 1992, "III.3: The Influence of Solute Structure, Temperature and Eluente Composition on the Chiral Separation of 21 Aminotetralins on a Cellulose tris-3,5-dimethylcarbamate Stationary Phase in High Performance Liquid Chromatography". *Chirality*, v. 4, pp. 389-394.
- WOOD, S. A., PEGG, S. N., SIMMONDS, R. J. *et al.*, 1996, "Development of Chiral High Performance Liquid Chromatographic Assays for the Enantiomers of 8-hydroxy-(di-*n*-propylamino) Tetralin and Three 8-keto-pyrrole-substituted Analogues". *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 14, pp. 1591-1599.
- WOOD, S. A., LONG, J. M., SIMMONDS, R. J., BRIDGES, J. W. *et al.*, 1997, "Optimisation of the Enantiomeric Separation of 12 2-aminotetralin Analogues Using Chiral AGP High-performance Liquid Chromatography by Simultaneous Factorial Desing". *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 16, pp. 231-237.
- WOOTEN, M. D., KING, D. K., 1993, "Adrenal Cortical Carcinoma: Epidemiology and Treatment with Mitotane and a Review of the Literature". *Cancer*, v. 72, pp. 3145-3155.
- YANG, Y., SU, B., YAN, Q. *et al.*, 2005, "Separation of Naproxen Enantiomers by Supercritical/Subcritical Fluid Chromatography". *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 39, pp. 815-818.
- YONKER, C. R., SMITH R. D., "Effect of the Partial Molar Volume of the Solute in the Stationary Phase on Retention in Supercritical Fluid Chromatography". *Journal of Chromatography A*, v. 459, pp. 183-191.
- YU, H. W., CHING, C. B., 2002, "Optimization of a Simulated Moving Bed Based on an Approximated Langmuir Model". *AIChE Journal*, v. 48, pp. 2240-2246.
- ZANCANELLA, P., 2008, *Mitotano: Metabolismo Enantiosseletivo, Encapsulação em Lipossomoas e Avaliação in vitro e in vivo*. Tese de D.Sc., UFPR, Curitiba, PR, Brasil.
- ZHANG, L., SELKER, J., QU, A. *et al.*, 2001, "Numerical Estimation of Multicomponent Adsorption Isotherms in Preparative Chromatography: Implications of Experimental Error". *Journal of Chromatography A*, v. 934, pp. 13-18.

- ZHANG, Z., MAZZOTTI, M., MORBIDELLI, M., 2003, "Powerfeed Operation of Simulated Moving Bed Units: Changing Flow-rates During the Switching Interval". *Journal of Chromatography A*, v. 1006, pp. 87-99.
- ZHANG, Z., MAZZOTTI, M., MORBIDELLI, M., 2004, "Experimental Assessment of Power Feed Chromatography". *AIChE Journal*, v. 50, pp. 625-632.
- ZHANG, Y., ROHANI, S., RAY, A. K., 2008, "Numerical Determination of Competitive Adsorption Isotherm of Mandelic Acid Enantiomers on Cellulose-based Chiral Stationary Phase". *Journal of Chromatography A*, v. 1202, pp. 34-39.
- ZHOU, D., CHERRAK, D. E., KACZMARSKI, K. *et al.*, 2003, "Prediction of the Band Profiles of the Mixtures of the 1-indanol Enantiomers from Data Acquired with Single Racemic Mixture". *Chemical Engineering Science*, v. 58, pp. 3257-3272.