



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

BÁRBARA VASCONCELOS DE FARIAS

**AVALIAÇÃO DO EQUILÍBRIO DE ADSORÇÃO E PROJETO DE
CONDIÇÕES DE SEPARAÇÃO DE PRAZIQUANTEL POR
CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)**

FORTALEZA – CE
2013

BÁRBARA VASCONCELOS DE FARIAS

**AVALIAÇÃO DO EQUILÍBRIO DE ADSORÇÃO E PROJETO DE
CONDIÇÕES DE SEPARAÇÃO DE PRAZIQUANTEL POR
CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)**

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Engenharia Química, da Universidade Federal do Ceará, como requisito para a obtenção do grau de Mestre em Engenharia Química.

Área de concentração: Processos Químicos e Bioquímicos.

Orientadores: Dr. Ivanildo José da Silva Júnior.

**FORTALEZA – CE
2013**

BÁRBARA VASCONCELOS DE FARIAS

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Engenharia Química, da Universidade Federal do Ceará, como requisito para a obtenção do grau de Mestre em Engenharia Química.

Aprovada em ____ / ____ / ____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Ivanildo José da Silva Júnior (Orientador)
Universidade Federal do Ceará

Prof. Dr. Amaro Gomes Barreto Júnior
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Prof. Dr. César Costapinto Santana
Universidade Tiradentes

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me dar saúde e perseverança para seguir sempre em frente e coragem para enfrentar as dificuldades que a vida nos impõe.

Ao meu orientador, Prof. Ivanildo, por todos esses anos de orientação e amizade e, principalmente, por muitas vezes acreditar mais do que eu mesma na minha capacidade. Serei sempre grata por toda a confiança e apoio depositados em mim.

Aos que me receberam na UFRJ e me ajudaram ao longo deste trabalho, em especial meu co-orientador, Prof. Amaro, peça essencial na execução deste trabalho do início ao fim. Obrigada pelos encontros no fundão, pelas discussões sobre o assunto, pela paciência com os e-mails que, tenho certeza, acumulei em sua caixa de entrada e pelas reuniões no Skype.

A toda minha família, em especial meus pais, José Wilson e Irene, por sempre esperarem o melhor de mim e, por isso, me fazer dar o melhor de mim para fazer valer a pena o esforço deles de uma vida inteira. Devo agradecer principalmente minha tão querida mãe, por ser a melhor mãe que alguém pode imaginar ter, por poder confiar e contar com ela pra tudo, por compreender ou no mínimo aceitar, mas sempre apoiar todas as decisões que faço em minha vida. Obrigada também a minha tia Áurea por estar sempre ali, reforçando o time dos meus pais, fazendo o possível e o impossível para o meu bem e para me ver feliz.

Ao meu quase marido, Rodrigo Félix, por existir em minha vida. Por todo o apoio e paciência (muita!) que me dedicou no decorrer deste trabalho. Por acreditar nos meus sonhos mesmo quando eles parecem impossíveis pra mim. Por me mostrar nas atitudes diárias e na convivência de todos esses anos o quanto eu sou sortuda por tê-lo em minha vida.

A minha irmã, Daniela, que esteve distante durante o decorrer deste trabalho, mas que nem por isso se tornou menos importante. Compartilhamos angústias de estudantes de mestrado e a imensa saudade que a distância nos traz. Agradeço então existência da internet que nos permite minimizar essa saudade todos os dias.

E representando todos os meus amigos, agradeço a Érika Pagan por ser a grande amiga que é em todos os momentos. Sejam eles ruins ou bons, ela esteve presente em todos eles desde 2006 me fazendo o bem. Eu não sei retribuir de outra forma a não ser tentando fazer o mesmo por ela.

Ao grupo de pesquisa em separações por adsorção, GPSA, do qual fiz parte durante toda minha vida acadêmica, pela oportunidade de fazer parte do grupo.

A Profa. Diana por servir de inspiração profissional e pessoal pra mim. Gostaria de um dia ter o conhecimento sobre tantas coisas quanto ela tem e de saber utilizar esse conhecimento da forma como ela utiliza.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES, pelo suporte financeiro.

*“Who’s to say what’s impossible? Well they forgot,
This world keeps spinning and with each new day,
I can feel a change in everything...
... And as my mind begins to spread its wings,
There’s no stopping in curiosity.”*

Upside down – Jack Johnson

RESUMO

O praziquantel (PZQ) é um medicamento anti-helmíntico de alto espectro utilizado no tratamento de todos os tipos de esquistossomose. No Brasil a mistura racêmica é utilizada na fabricação do medicamento. Sabe-se que a espécie enantiomérica R-PZQ é a que possui efeito anti-helmíntico e que esta espécie possui sabor menos amargo. Sendo assim formulações baseadas no R-PZQ somente teriam metade da dose necessária da formulação sólida da mistura racêmica e as formulações líquidas teriam sabor menos amargo. Para obtenção de enantiômeros puros a cromatografia quiral é uma técnica promissora por produzir enantiômeros com grau de pureza bastante elevada. Neste trabalho a separação dos enantiômeros do fármaco praziquantel foi realizada em uma fase estacionária quiral (FEQ) celulose tris(3-cloro-4-metilfenilcarbamato), comercialmente conhecida como Lux Celulose-2, por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Ensaios em solução diluída (1 g/L) e soluções concentradas (5, 10, 15 e 20 g/L) foram realizados em laboratório. Em todos estes experimentos foram estudados os efeitos da variação da vazão da fase fluida (0,5, 1 e 2 mL/min) e do volume de injeção (20, 60 e 100 μ L). Nestes foram alcançadas separações por linha de base indicando alta eficiência da coluna para a separação requerida. Experimentos com solução de PZQ de 40 g/L e com vazão de fase fluida de 1 mL/min foram realizados objetivando encontrar as condições em que ocorreria sobreposição dos picos. Os enantiômeros foram separados satisfatoriamente nos volumes de injeção testados (100, 140 e 180 μ L), com indicação de sobreposição no volume injetado de 250 μ L obtendo-se uma produtividade de 533 mg/dia no limite de separação por linha de base. Pelos resultados obtidos pode-se prever um comportamento não linear da isoterma de equilíbrio de adsorção. Foram estimados parâmetros da isoterma de Langmuir competitivo a partir dos experimentos nas concentrações de 5 g/L a 20 g/L por um método híbrido entre o método dos tempos de retenção e o método inverso a partir de uma solução analítica do modelo ideal. Esses parâmetros foram utilizados em um programa computacional desenvolvido no Fortran® objetivando a simulação para predição dos perfis cromatográficos pelo modelo do equilíbrio dispersivo. Os perfis obtidos na simulação representaram bem os dados experimentais quando comparados os tempos de retenção da frente de massa de ambos os enantiômeros. Os parâmetros estimados também foram utilizados na predição dos perfis cromatográficos para as condições de 40 g/L e apresentaram resultados satisfatórios quando os erros de predição foram levados em consideração.

Palavras-chave: Praziquantel, Enantiômeros, CLAE, Langmuir, modelo do equilíbrio dispersivo.

ABSTRACT

Praziquantel is a high spectrum anthelmintic drug used in the treatment of all types of schistosomiasis. In Brazil, the racemic mixture is used on the drug manufacture. It is known that the R-PZQ enantiomeric species is the one which has the anthelmintic effect and a less bitter taste. Thus, the solid formulations based on R-PZQ only, would have half of the dosage and the liquid formulations would have a less bitter taste. To obtain pure enantiomers chiral chromatography is a promising technique which produces high purity enantiomers. In this work the praziquantel enantiomers separation was obtained on a cellulose tris(3-chlorine-4-methyl-phenyl-carbamate) chiral stationary phase (CSP), commercially known as Lux Cellulose-2, by high performance liquid chromatography (HPLC). Experiments with diluted solution (1 g/L) and concentrated solutions (5, 10, 15 and 20 g/L) were carried out. On these experiments the effects of the mobile phase flow rate variation (0,5, 1 e 2 mL/min) and the injection volume (20, 60 e 100 μ L) have been studied. On these baseline separations were achieved indicating high column efficiency for the required separation. Experiments with 40 g/L PZQ solution and a mobile phase flow rate of 1 mL/min were performed aiming to find conditions on which overlapping peaks occur. The enantiomers were well separated on the tested injection volumes (100, 140 and 180 μ L), indicating an overlapping on the injection volume of 250 μ L yielding a productivity of 533 mg per day at the limit of baseline separation. From the results one can predict a nonlinear adsorption equilibrium isotherm behavior. Parameters of the competitive Langmuir isotherm were estimated from experiments in the concentration range 5g/L to 20 g/L by a hybrid method between the retention time method and the inverse method by an analytical solution of the ideal model. These parameters were used on a computer program developed in Fortran® aiming at the prediction of the chromatographic profiles by the Equilibrium Dispersive Model. The profiles obtained from the simulation represent well the experimental data when comparing the front mass retention times of both enantiomers. The estimated parameters were also used on the prediction of the chromatographic profiles obtained for 40 g/L conditions and showed satisfactory results when prediction errors were taken into account.

Keywords: Praziquantel, enantiomers, HPLC, Langmuir, equilibrium dispersive model.

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1	Obtenção de enantiômeros puros (adaptado de Silva Jr. <i>et al</i> , 2006).	6
Figura 2.2	Diagrama esquemático de um sistema em batelada de cromatografia (adaptado de Seidel-Morgenstern, 1998).	7
Figura 2.3	Diagrama esquemático de um leito móvel simulado com quatro zonas (adaptado de Zhang et al., 2007).	9
Figura 2.4	Estrutura química do praziquantel.	12
Figura 3.1	Estrutura química da FEQ utilizada – celulose tris(3-cloro-4-metilfenilcarbamato).	27
Figura 3.2	Diagrama esquemático do sistema de CLAE utilizado na realização dos experimentos.	28
Figura 4.1	Comparação dos perfis cromatográficos da solução de PZQ. Concentração: 1 g/L; vazão da fase móvel: 0,5 mL/min; volume de injeção: 20, 60 e 100 µL; fase móvel: etanol; temperatura: 25°C; comprimento de onda: 210 nm.	38
Figura 4.2	Comparação dos perfis cromatográficos da solução de PZQ. Concentração: 1 g/L; vazão da fase móvel: 1 mL/min; volume de injeção: 20, 60 e 100 µL; fase móvel: etanol; temperatura: 25°C; comprimento de onda: 210 nm.	38
Figura 4.3	Comparação dos perfis cromatográficos da solução de PZQ. Concentração: 1 g/L; vazão da fase móvel: 2 mL/min; volume de injeção: 20, 60 e 100 µL; fase móvel: etanol; temperatura: 25°C; comprimento de onda: 210 nm.	39
Figura 4.4	Comparação dos perfis cromatográficos da solução de PZQ. Concentração: 1 g/L; vazão da fase móvel: 0,5, 1 e 2 mL/min; volume de injeção: 20 µL; fase móvel: etanol; temperatura: 25°C; comprimento de onda: 210 nm.	40
Figura 4.5	Comparação dos perfis cromatográficos da solução de PZQ. Concentração: 1 g/L; vazão da fase móvel: 0,5, 1 e 2 mL/min; volume de injeção: 60 µL; fase móvel: etanol; temperatura: 25°C; comprimento de onda: 210 nm.	40
Figura 4.6	Comparação dos perfis cromatográficos da solução de PZQ. Concentração: 1g/L; vazão da fase móvel: 0,5, 1 e 2 mL/min; volume de injeção: 100 µL; fase móvel: etanol; temperatura: 25°C; comprimento de onda: 210 nm.	41
Figura 4.7	Comparação dos perfis cromatográficos da solução de PZQ. Concentração: 5, 10, 15 e 20 g/L; vazão da fase móvel: 1 mL/min; volume de injeção: 20 µL; fase móvel: etanol; temperatura: 25°C; comprimento de onda: 210 nm.	44
Figura 4.8	Comparação dos perfis cromatográficos da solução de PZQ. Concentração: 5, 10, 15 e 20 g/L; vazão da fase móvel: 1 mL/min; volume de injeção: 60 µL; fase móvel: etanol; temperatura: 25°C; comprimento de onda: 210 nm.	44
Figura 4.9	Comparação dos perfis cromatográficos da solução de PZQ. Concentração: 5, 10, 15 e 20 g/L; vazão da fase móvel: 1 mL/min; volume de injeção: 100 µL; fase móvel: etanol; temperatura: 25°C;	45

	comprimento de onda: 210 nm.	
Figura 4.10	Perfis cromatográficos com sobrecarga de volume. Nas concentrações de 5 g/L (a, e e i), 10g/L (b, f e j), 15g/L (c, g e k) e 20 g/L (d, h e l) e nas vazões de 0,5 mL/min (a, b, c e d), 1mL/min (e, f, g e h) e 2mL/min (i, j, k e l). Fase móvel: etanol; temperatura: 25°C; comprimento de onda: 210 nm.	46
Figura 4.11	Isotermas obtidas para os enantiômeros do praziquantel por um método híbrido entre o método dos tempos de retenção e o método inverso. Temperatura: 25°C.	48
Figura 4.12	Mínimos quadrados para cada experimento.	50
Figura 4.13	Perfis cromatográficos experimental e simulado, respectivamente, na concentração de 20 g/L, vazão de 1 mL/min e volumes de injeção de 20, 60 e 100 µL. Fase móvel: etanol; temperatura: 25°C.	52
Figura 4.14	Tempos de retenção da frente de massa simulados e experimentais para um volume de injeção de 20 µL.	53
Figura 4.15	Tempos de retenção da frente de massa simulados e experimentais para um volume de injeção de 60 µL.	54
Figura 4.16	Tempos de retenção da frente de massa simulados e experimentais para um volume de injeção de 100 µL.	54
Figura 4.17	Erro (%) <i>versus</i> volume de injeção (µL).	55
Figura 4.18	Erro (%) <i>versus</i> vazão da fase móvel (mL/min).	56
Figura 4.19	Erro (%) <i>versus</i> massa injetada (mg).	57
Figura 4.20	Perfis cromatográficos de PZQ sobre condições de sobrecarga. Concentração: 40 g/L; vazão da fase móvel: 1 mL/min; volume de injeção: 100, 140, 180 e 250 µL; fase móvel: etanol; temperatura: 25°C; comprimento de onda: 210 nm.	58
Figura 4.21	Perfis cromatográficos experimental e simulado, respectivamente, nas condições de 40 g/L, 1mL/min e 250 µL injetados. Fase móvel: etanol; temperatura: 25°C.	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1	Principais métodos de determinação de isotermas de equilíbrio e suas características (Adaptado de Schmidt-Traub, 2005).	19
Tabela 3.1	Matriz das condições experimentais nas quais os experimentos foram realizadas e quantidade de PZQ injetado em cada uma delas.	31
Tabela 4.1	Parâmetros analíticos de separação do praziquantel na coluna Lux-2 a diferentes vazões.	43
Tabela 4.2	Parâmetros estimados da isoterma de Langmuir competitivo.	47
Tabela 4.3	Valores utilizados no teste F.	49
Tabela 4.4	Dados de entrada utilizados na simulação.	51
Tabela 4.5	Erros percentuais para as simulações sobre condições de sobrecarga de volume.	61

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Símbolo	Descrição
AF	Análise Frontal
AFPC	Análise Frontal por Pontos Característicos
BDF	<i>Backward Differentiation Formulae</i>
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
EPC	Eluição por Pontos Característicos
FEQ	Fase Estacionária Quiral
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
GRG	Gradiente Reduzido Generalizado
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
LaSiFA	Laboratório de Sistemas Farmacêuticos Avançados
LMS	Leito Móvel Simulado
MCTA	Triacetato de celulose microcristalina
MI	Método Inverso
MP	Método da Perturbação
MTR	Método do Tempo de Retenção
PZQ	Praziquantel
RENAME	Relação Nacional de Medicamentos Essenciais
TTBB	Tri- <i>terc</i> -butilbenzeno

LISTA DE SÍMBOLOS

Símbolo	Descrição
$\hat{\sigma}_y^2$	Variância de predição do modelo
σ_y^2	Variância dos erros experimentais
μ_t	Primeiro momento absoluto
a_1, a_2, b_1, b_2	Parâmetros da isoterma de Langmuir competitivo
a_p	Área da superfície externa das partículas adsorventes
$b_{ns,i}$	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 enantioseletivos
C_1^0	Concentrações inicial do componente 1
C_1^A	Concentração do primeiro componente na frente de massa
C_2^0	Concentração inicial do componente 2
C_i	Concentração do componente i na fase móvel
C_p	Concentração do componente i na fase fluida estagnada nos poros das partículas
C_S	Concentração da solução
$D.P.$	Desvio padrão
D_{ap}	Coefficiente de dispersão aparente
D_L	Coefficiente de dispersão axial
D_p	Coefficiente de difusão no poro
ε	Porosidade total da coluna
ε_p	Porosidade das partículas
F	Razão entre as fases móvel e estacionária
$F.O.$	Função Objetivo
h	Constante de equilíbrio linear
k_f	Coefficiente de transferência de massa externo
k_i	Fator de retenção do componente i
k_m	Coefficiente de transferência de massa global
L'_f	Fator que caracteriza a sobrecarga da coluna
NE	Número de experimentos considerados
N_i	Número de pratos teóricos do componente i
NP	Número de parâmetros estimados
Q	Vazão da fase móvel
q^*	Quantidade adsorvida do componente i na coluna em equilíbrio com a concentração C na fase móvel
q_i	Concentração do componente i na fase estacionária
q_{ns}	Capacidade de saturação dos sítios não-seletivos
q_s	Capacidade de saturação dos sítios enantioseletivos

r_1	Raiz positiva da Equação 2.9
r_2	Raiz negativa da Equação 2.9
R_p	Raio das partículas
R_s	Resolução cromatográfica
t	Variável independente – tempo
t_0	Tempo morto
$t_{R,2}^0$	Tempo de retenção de frente de massa de uma concentração igual a zero do componente 2
t_{fri}	Tempo da frente de rompimento do componente menos retido
t_{lb}	Tempo de retorno a linha de base do pico menos retido
t_p	Largura de um pulso de injeção retangular
$t_{R,1}$	Tempo de retenção da frente de massa do componente 1
$t_{R,1calc}$	Tempo de retenção da frente de massa do componente 1 calculado
$t_{R,1exp}$	Tempo de retenção da frente de massa do componente 1 experimental
$t_{R,2}$	Tempo de retenção da frente de massa do componente 2
$t_{R,2calc}$	Tempo de retenção da frente de massa do componente 2 calculado
$t_{R,2exp}$	Tempo de retenção da frente de massa do componente 2 experimental
$t_{r,i}$	Tempo de retenção do componente i
t_{rjl}	Tempo de retorno do componente mais retido, j, a linha de base
u	Velocidade intersticial
V_C	Volume da coluna cromatográfica
V_{inj}	Volume de injeção
w_i	Largura do pico do componente i
z	Variável independente – comprimento da coluna
α	Seletividade
γ	Variável auxiliar
ν	Número de graus de liberdade

SUMÁRIO

1. Introdução.....	1
1.1. <i>Motivoção.....</i>	1
1.2. <i>Objetivos.....</i>	2
1.2.1. <i>Objetivo Geral.....</i>	2
1.2.2. <i>Objetivos Específicos.....</i>	3
1.3. <i>Descrição do conteúdo da dissertação.....</i>	3
2. Revisão Bibliográfica.....	4
2.1 <i>Os enantiômeros e os fármacos quirais.....</i>	4
2.2 <i>Resolução de misturas racêmicas por cromatografia líquida quiral.....</i>	5
2.3 <i>Processos cromatográficos para obtenção de enantiômeros puros.....</i>	7
2.3.1 <i>Modo em batelada.....</i>	7
2.3.2 <i>Modo contínuo.....</i>	8
2.3.3 <i>Projeto de condições operacionais.....</i>	10
2.4 <i>Fármaco praziquantel e a separação de seus enantiômeros.....</i>	11
2.4.1 <i>Praziquantel.....</i>	11
2.4.2 <i>Separação dos enantiômeros do PZQ.....</i>	13
2.5 <i>Obtenção de parâmetros cromatográficos.....</i>	14
2.5.1 <i>Parâmetros analíticos de separação.....</i>	14
2.6 <i>Isotermas de equilíbrio adsorção.....</i>	15
2.6.1 <i>Modelo Langmuir competitivo.....</i>	16
2.6.2 <i>Modelo bi-Langmuir competitivo.....</i>	17
2.6.3 <i>Modelo Langmuir competitivo modificado.....</i>	17
2.7 <i>Métodos de determinação de isotermas de adsorção.....</i>	18
2.7.1 <i>Análise frontal.....</i>	18
2.7.2 <i>Análise frontal por pontos característicos.....</i>	20
2.7.3 <i>Eluição por pontos característicos.....</i>	20
2.7.4 <i>Método de perturbação.....</i>	21
2.7.5 <i>Método do tempo de retenção.....</i>	22
2.7.6 <i>Método inverso.....</i>	22
2.8 <i>Modelagem matemática de colunas cromatográficas.....</i>	23
2.8.1 <i>Modelo geral.....</i>	23
2.8.2 <i>Modelo do transporte dispersivo.....</i>	25
2.8.3 <i>Modelo do equilíbrio dispersivo.....</i>	25
2.8.4 <i>Modelo ideal.....</i>	26
3. Materiais e Métodos.....	27
3.1 <i>Materiais.....</i>	27
3.1.1. <i>Praziquantel.....</i>	27
3.1.2. <i>A coluna quiral.....</i>	27
3.1.3. <i>Aparelhagem Experimental.....</i>	27
3.2. <i>Métodos.....</i>	28
3.2.1. <i>Experimentos com soluções diluídas.....</i>	28
3.2.1.1. <i>Obtenção da porosidade total.....</i>	29

3.2.1.2. <i>Obtenção dos parâmetros analíticos de separação</i>	29
3.2.1.3. <i>Identificação dos tempos de retenção</i>	30
3.2.2. <i>Experimentos com soluções concentradas</i>	30
3.2.3. <i>Determinação dos parâmetros da isoterma de Langmuir competitivo</i>	31
3.2.4. <i>Simulação utilizando o Modelado equilíbrio dispersivo</i>	34
4. Resultados e Discussão	37
4.1. <i>Determinação da porosidade total</i>	37
4.2. <i>Análise dos perfis de eluição da solução diluída de PZQ</i>	37
4.3. <i>Análise dos parâmetros analíticos de separação</i>	41
4.4. <i>Análise dos perfis de sobrecarga</i>	43
4.5. <i>Estimativa dos parâmetros da isoterma de Langmuir competitivo</i>	47
4.5.1. <i>Qualidade do ajuste obtido</i>	48
4.6. <i>Avaliação dos resultados obtidos pelo Modelo do Equilíbrio Dispersivo</i>	51
4.6.1. <i>Avaliação dos erros percentuais entre os dados experimentais e simulados</i> ..	55
4.7. <i>Verificação da qualidade da predição do comportamento da coluna em condições de sobrecarga de volume</i>	57
5. Conclusões	62
5.1. <i>Sugestões para trabalhos futuros</i>	63
Referências	65
Apêndice	73
Anexos	75

1. Introdução

1.1 Motivação

Enantiômeros são isômeros idênticos no que diz respeito a ligações atômicas e a ordenação nas moléculas, porém diferem pela maneira em que seus átomos se dispõem. A mistura de moléculas deste tipo em uma solução chama-se racemato ou mistura racêmica. As moléculas cujas imagens não são sobreponíveis chamam-se quirais.

Diversos aminoácidos presentes nos seres vivos são quirais e suas interações com outras moléculas quirais são estereoespecíficas, ou seja, acontecem somente com determinados estereoisômeros. Assim, o estudo da quiralidade dos compostos químicos, em particular dos compostos terapêuticos, é de fundamental importância do ponto de vista farmacológico, farmacocinético e toxicológico, uma vez que muitos fármacos são administrados na forma racêmica, podendo os enantiômeros ter efeitos diferentes no organismo ou ainda, em casos mais simples, um dos enantiômeros ter efeito inerte (Singh *et al.*, 2006).

Métodos tradicionais, tais como cristalização fracionada ou destilação fracionada, não separam com eficiência uma mistura racêmica, devido à grande semelhança estrutural entre os dois enantiômeros. Sendo assim, duas rotas independentes podem ser utilizadas na obtenção de enantiômeros puros. Uma delas é a síntese enantioseletiva, onde somente o enantiômero de interesse é obtido (Roszkowski *et al.*, 2006), a outra diz respeito à síntese da mistura racêmica e separação dos enantiômeros utilizando cristalização diastereoisomérica ou cromatografia quiral (Kim *et al.*, 1998; Francotte, 2001). A cromatografia quiral é preferida frente à cristalização diastereoisomérica por produzir dois enantiômeros com elevado grau de pureza óptica, condição indispensável para testes farmacocinéticos, farmacológicos e farmacodinâmicos (Rekoske, 2001; Silva Jr., 2006).

O praziquantel (PZQ), cujo nome químico é (\pm)-2ciclo-hexilcarbonil-1,2,3,6,7,11b-hexa-hidro-4H-pirazino[2,1-a]isoquinolin-4-ona, é um anti-helmíntico de alto espectro utilizado no tratamento de todos os tipos de esquistossomose (Kumar e Gryseels, 1994).

No Brasil, a mistura racêmica é utilizada para formulação do medicamento e consta na Relação Nacional de Medicamentos Essenciais (RENAME, 2008), sendo o Ministério da Saúde responsável pelas formulações sólidas e líquidas de PZQ. Porém, sabe-se que a espécie enantiomérica (R)-PZQ apresenta atividade anti-helmíntica, enquanto a espécie (S)-PZQ não possui efeito (Liu *et al.*, 1997). Sabe-se também que a formulação líquida baseada no (R)-PZQ apresenta sabor menos amargo que a formulação baseada na mistura racêmica. Estas informações mostram que a substituição da mistura racêmica de praziquantel pela espécie (R)-PZQ leva à redução da dose necessária para a metade na formulação sólida e reduz o sabor amargo de formulações líquidas, fator importante para a adesão de crianças ao tratamento (Meyer *et al.*, 2009).

A síntese da mistura racêmica é um procedimento de baixo custo, isso incentiva o uso desse procedimento em aplicações preparativas e industriais levando ao uso de cromatografia quiral para a preparação de (R)-PZQ enriquecido ou purificado (Roskowski *et al.*, 2006). Por este motivo trabalhos anteriores utilizaram cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para promover a separação dos enantiômeros do PZQ com coluna de fase estacionária quiral (FEQ). Ching *et al.* (1993) desenvolveram um processo cromatográfico contínuo em escala preparativa para separação destes enantiômeros usando triacetato de celulose microcristalina (MCTA) como fase estacionária e metanol como fase móvel. Ching e Lee (1996) utilizaram fases estacionárias com seletores quirais baseados em derivados de celulose (Chiralcel OD® e OJ®) e amilose (Chiralpak AD®) recobertos em sílica e metanol como fase móvel não obtiveram alto potencial de discriminação. Visto isso, o presente projeto é parte de uma cooperação das instituições de pós-graduação envolvidas (Universidade Federal do Ceará e Universidade Federal do Rio de Janeiro) e o Ministério da Saúde, através do Laboratório de Sistemas Farmacêuticos Avançados (LaSiFA) de Farmanguinhos (FIOCRUZ), que objetiva o uso do (R)-PZQ na investigação do uso de formulações líquidas e sólidas enriquecidas neste enantiômero.

1.2 Objetivos

1.2.1 Objetivo Geral

Este trabalho tem como objetivo a separação dos enantiômeros do praziquantel por cromatografia líquida de alta eficiência utilizando uma fase estacionária quiral

baseada em celulose (Lux Celulose-2) e o estudo da separação em condições de sobrecarga, bem como estimação de parâmetros da isoterma de equilíbrio. Esse estudo visa obtenção de condições ótimas de operação para futura aplicação preparativa e separação dos enantiômeros do praziquantel em modo contínuo.

1.2.2 Objetivos Específicos

- Avaliação da eficiência da coluna Lux celulose-2 na separação dos enantiômeros propostos a partir da obtenção de perfis cromatográficos com soluções diluídas de PZQ para estudo.
- Estudo da separação em condições de sobrecarga de volume e de massa pela obtenção de perfis cromatográficos com soluções concentradas de PZQ.
- Estimação dos parâmetros da isoterma de Langmuir competitivo por um método híbrido entre o método do tempo de retenção e o método inverso pela utilização dos perfis em condições de sobrecarga para
- Simulação com os parâmetros obtidos para a isoterma de Langmuir competitivo a fim de reproduzir os experimentos realizados em laboratório e assim servir como ferramenta de predição do comportamento da coluna.

1.3 Descrição do conteúdo da dissertação

Neste capítulo foram apresentados a motivação e os objetivos deste estudo. De modo a centralizar o objeto de estudo desta dissertação, serão apresentados os fundamentos teóricos e a revisão bibliográfica sobre o assunto abordado no próximo capítulo. No 3º capítulo serão apresentados os materiais e métodos utilizados para a execução deste trabalho. Os resultados e a discussão dos procedimentos experimentais e simulação estão no 4º capítulo deste documento. E, por fim, no 5º capítulo estão as conclusões.

2. Revisão Bibliográfica

2.1 Os enantiômeros e os fármacos quirais

Enantiômeros são isômeros de mesma fórmula molecular, nos quais a molécula apresenta a geometria e a disposição espacial de seus átomos igual à imagem especular do seu par complementar (Lima, 1997; Solomons & Fryhle, 2000). Apresentam as mesmas propriedades físicas e químicas como, por exemplo, ponto de fusão e ebulição e densidade. Entretanto, diferem no que diz respeito à maneira como os enantiômeros interagem com o plano de luz polarizada, ocorrendo rotações em diferentes direções dependendo do composto (Allinger *et al.*, 1978).

Existe uma nomenclatura atribuída aos enantiômeros que está relacionada a essa capacidade de desviar a luz plano-polarizada. Se o feixe que emerge de uma substância opticamente ativa for para a direita, diz-se que é uma substância *dextrógira* (d) ou (+); se o feixe for para a esquerda, a substância diz-se *levógira* (l) ou (-) (Morrison e Boyd, 1983; Solomons & Fryhle, 2000).

Outra nomenclatura é atribuída ao arranjo espacial do composto, em que os enantiômeros recebem os prefixos R ou S seguindo sistema desenvolvido pelos químicos R. S. Cahn, C. K. Ingold e V. Prelog em 1966 e adotado pela International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) (Francotte, 2001).

Os enantiômeros são frequentemente designados como isômeros ópticos uma vez que a não sobreposição de um objeto e a sua imagem em um espelho determina a existência da atividade óptica, possuindo um centro quiral ou centro de assimetria. Todas as moléculas quirais possuem enantiômeros e todas as moléculas opticamente ativas são quirais (Solomons & Fryhle, 2000).

Uma mistura equimolar de dois enantiômeros é chamada de racemato ou mistura racêmica. Essa mistura não apresenta rotação de luz plano-polarizada, visto que para qualquer orientação possível de um enantiômero, existiria uma molécula do outro enantiômero em uma orientação de imagem especular. Havendo assim cancelamento exato de todas as rotações resultando no fato de que uma mistura equimolar de enantiômeros é opticamente inativa, sendo frequentemente representada como (\pm) (Solomons & Fryhle, 2000).

A quiralidade é uma propriedade intrínseca nos seres vivos, já que diversos aminoácidos e açúcares são quirais. Suas interações com outras moléculas quirais são estereoespecíficas, ou seja, essas moléculas realizam um reconhecimento seletivo dos enantiômeros e interagem de maneira diferente com cada um deles, resultando, na maioria das vezes, em diferentes respostas biológicas (Maier *et al.*, 2001).

Assim, o estudo da quiralidade dos compostos químicos, em particular dos compostos terapêuticos, é de fundamental importância do ponto de vista farmacológico, farmacocinético e toxicológico, uma vez que muitos fármacos são administrados na forma racêmica, podendo os enantiômeros ter efeitos diferentes no organismo, como causar efeitos colaterais ou ainda, em casos mais simples, um dos enantiômeros ter efeito inerte.

Como exemplo da importância da quiralidade na indústria farmacêutica pode-se citar o caso da talidomida, que na década de 60 era comercializado como sedativo para aliviar náuseas matinais nas gestantes. Ocorre que o (-)-(S)-enantiômero apresenta efeitos teratogênicos e, por falta de conhecimento das diferenças toxicológicas dos enantiômeros, acarretou na má formação de milhares de fetos (Caldwell, 1995). A partir de então, passou-se a estudar a influência do arranjo espacial dos átomos nas moléculas na interação com as macromoléculas biológicas e o quanto isso influenciava os processos bioquímicos, fisiológicos e farmacológicos (Orlando *et al.*, 2007).

A obtenção de substâncias opticamente puras tornou-se um grande desafio para os pesquisadores e para a indústria farmacêutica. Os órgãos reguladores internacionais introduziram legislações mais rígidas no controle clínico dos medicamentos e exigiram da indústria farmacêutica a comercialização de medicamentos na sua forma enantiomericamente pura, isso devido à experiência que foi acumulada ao longo dos anos.

2.2 Resolução de misturas racêmicas por cromatografia líquida quiral

Devido a grande semelhança física e estrutural entre os enantiômeros não é possível separá-los por métodos tradicionais de separação, como destilação fracionada, já que seus pontos de ebulição são idênticos; cristalização fracionada, pois as

solubilidades de ambos os enantiômeros em dado solvente são iguais, a menos que o solvente seja opticamente ativo, ou cromatografia clássica, pois eles são adsorvidos com igual força por um dado solvente, a menos que seja opticamente ativo (Morrison e Boyd, 1983).

Sendo assim, duas rotas são utilizadas na obtenção de enantiômeros puros, como mostrado na Figura 2.1, a síntese enantioseletiva, uma rota quiral, na qual somente o enantiômero de interesse é obtido, e a síntese de uma mistura racêmica e posterior separação dos enantiômeros, rota racêmica (Roszkowski *et al.*, 2006; Francotte *et al.*, 2001).

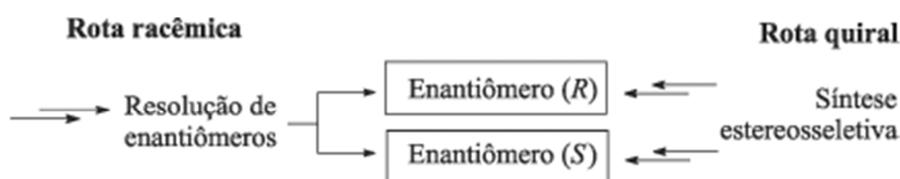


Figura 2.1 - Obtenção de enantiômeros puros (adaptado de Silva Jr. *et al.*, 2006).

A síntese enantioseletiva é útil na preparação de grandes quantidades de material, entretanto o tempo requerido na sua utilização pode torná-la impraticável e não atrativa, especialmente em casos onde somente pequenas quantidades do enantiômero são requeridas, como é o caso de algumas aplicações farmacêuticas. Devido a este fato a resolução da mistura racêmica é preferida por ter como vantagem a produção de dois enantiômeros com grau de pureza elevado, o que é muito importante em estudos farmacológicos, farmacodinâmicos e farmacocinéticos (Silva Jr., 2006).

Na fase de separação dos enantiômeros da mistura racêmica a cromatografia quiral tem sido uma alternativa promissora que tem se mostrado uma ferramenta bem estabelecida devido a suas vantagens, tais quais a aplicação a uma larga variedade de estruturas racêmicas, obtenção dos dois enantiômeros com elevado grau de pureza óptica e rapidez (Francotte *et al.*, 2001).

Henderson & Rule (1939) separaram lactose como primeira tentativa de demonstrar o potencial do método cromatográfico para separação em escala preparativa utilizando fase estacionária quiral. A partir daí, o método vem se desenvolvendo pelo crescimento paralelo entre as técnicas cromatográficas e o surgimento de novas FEQ's.

Esse desenvolvimento se deve principalmente ao reconhecimento da importância da relação entre a estereoquímica de um composto quiral e sua atividade biológica (Francotte, 1994). Por essas razões diversas drogas racêmicas de diferentes classes terapêuticas tem sido separadas por este método, como por exemplo analgésicos, tranquilizantes, diuréticos, anti-convulsivos e anti-helmínticos.

2.3 Processos cromatográficos para obtenção de enantiômeros puros

2.3.1 Modo em batelada

Quando se fala em separação de enantiômeros por cromatografia líquida de alta eficiência, a técnica mais utilizada é a clássica cromatografia em batelada, que consiste na introdução de uma solução que contém o racemato dissolvido no topo da coluna e eluição com uma fase móvel apropriada. Um esquema deste modo está mostrado na Figura 2.2. O tamanho da coluna é variável e depende da quantidade de soluto necessária. Por outro lado, em separações mais difíceis ou quando se deseja melhorar o rendimento são utilizadas frequentemente técnicas de corte de pico e de reciclo (Francotte, 2001; Francotte & Richert, 1997).

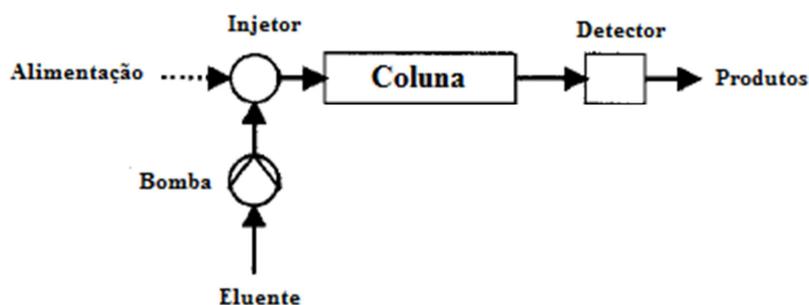


Figura 2.2 – Diagrama esquemático de um sistema em batelada de cromatografia (adaptado de Seidel-Morgenstern, 1998).

Pode-se dizer que a técnica de cromatografia em batelada é apropriada para produção de pequenas quantidades requeridas em uma fase inicial de desenvolvimento de um processo, isso baseado em investimento de capital, tempo de desenvolvimento, produtividade da tecnologia e necessidade de materiais (Kennedy *et al.*, 2004).

Apesar de suas vantagens, a aplicação desta técnica em escala industrial é limitada, pois requer utilização de grandes quantidades de adsorvente, alto consumo da fase móvel e a descontinuidade da operação, o que causa dificuldades na integração deste processo com outros que operam continuamente (Lim & Ching, 1996). Entretanto, uma parcela significativa desses contratempos têm sido superados devido a melhorias nas técnicas cromatográficas e ao desenvolvimento de novas fases estacionárias quirais relativamente baratas (Francotte, 1994).

Para escala semi-preparativa, com produtividade da ordem de dezenas de gramas por dia, o uso de técnicas contínuas não traz vantagens significativas, se considerado o alto custo fixo de uma unidade deste tipo (Grill, 2004; Santana *et al.*, 2010; Schlingea *et al.*, 2010).

2.3.2 Modo contínuo

Processos de separação cromatográfica quiral semi-preparativos e preparativos podem ser realizados usando sistemas com uma coluna e esquemas de injeções, coletas de frações e ciclos periódicos, operando de forma manual ou automatizada, de forma semi-contínua (Grill *et al.*, 1998, Silva Jr *et al.*, 2009; Schlinge *et al.*, 2009); ou por sistemas com múltiplas colunas e esquemas de alimentação contínua, coletas de frações e ciclos (Nicoud *et al.*, 1993, Barreto Jr *et al.*, 2008).

Com objetivo de superar as desvantagens da cromatografia em batelada, surgiram métodos cromatográficos contínuos contracorrente. Os processos cromatográficos contínuos originaram-se em 1947 com o desenvolvimento do processo *Hypersorption*, desenvolvido pela *Union Oil Co.*, para a purificação de hidrocarbonetos. Outro processo, o leito móvel simulado (LMS) tem sido bastante utilizado como alternativa á cromatografia de eluição clássica. Este método foi idealizado por Broughton e Gerhold e a tecnologia foi aplicada pela *Universal Oil Products (UOP)* na década de 1960 com o nome de *Sorbex*. O LMS foi destinado primeiramente à separação e recuperação de compostos petroquímicos e recuperação de frutose de misturas de glicose e frutose. Hoje em dia a tecnologia é amplamente utilizada nas indústrias petroquímicas, de processamento de açúcares e de química fina e para

separação de enantiômeros (Ching *et al.*, 1985; Subramani *et al.*, 2003; Rosa, 2005; Silva Jr. *et al.*, 2009).

A primeira publicação utilizando a tecnologia de LMS para separação enantiomérica foi em 1992, para separação de feniletanol em uma coluna Chiralcel OD (Negawa & Shoji, 1992). Desde então o processo LMS para separação de enantiômeros vem sendo largamente estudado (Ching *et al.*, 1993; Lim & Ching, 1996; Francotte & Richert, 1997; Heuer *et al.*, 1998; Zenoni *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2002; Wongso *et al.*, 2004, 2005; Araujo *et al.*, 2010; Antelo, 2011; Nowak *et al.*, 2012; Bentley *et al.*, 2013).

O leito móvel simulado nada mais é do que uma série de colunas cromatográficas conectadas em série e dividido em quatro zonas, podendo conter duas ou mais colunas por zona, como mostrado na Figura 2.3. O movimento contracorrente simulado entre as fases sólida e líquida é dado pela mudança periódica das linhas de alimentação, de extrato e de refinado por válvulas de multiposições, ao longo do leito no sentido do fluxo da fase líquida (Pais & Rodrigues, 2003; Zhang *et al.*, 2007).

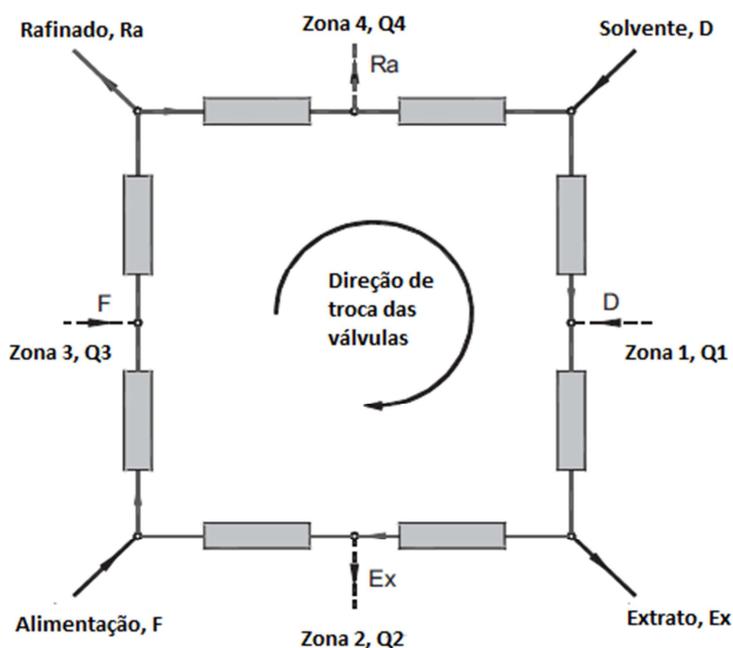


Figura 2.3 - Diagrama esquemático de um leito móvel simulado com quatro zonas (adaptado de Zhang *et al.*, 2007).

Outro método contínuo foi proposto pela Novasep (Vandoeuvre Les Nancy, França), a principal fornecedora de unidades industriais de LMS, o processo Varicol (Ludemann-Hombourger *et al.*, 2000). O princípio do processo Varicol é baseado em uma mudança de posição não sincronizada das válvulas de entrada e saída em um sistema com várias colunas, em contraste com a operação do LMS em que essa mudança de posição é sincronizada (Pais & Rodrigues, 2003).

Dado o número total de colunas empregadas em um processo Varicol o número de colunas em cada zona varia com o tempo, dentro de um período de comutação global, porém ao fim de cada período de comutação global cada zona contém o número de colunas que tinha inicialmente.

Além disso, uma porta pode mudar de posição mais de uma vez durante um período de comutação global, para frente ou ainda para trás. Sendo assim, o processo Varicol pode ter diferentes configurações de coluna, o que dá maior flexibilidade ao processo se comparado ao LMS. Vale ressaltar ainda que o processo Varicol não necessita de nenhum custo fixo adicional, sendo o custo fixo semelhante ao do LMS (Subramani *et al.*, 2003; Peper *et al.*, 2007).

2.3.3 Projeto de condições operacionais

A otimização das condições operacionais de um processo cromatográfico diz respeito à obtenção de valores para as variáveis de decisão que melhor atendam os critérios especificados para as variáveis de desempenho em cada etapa do processo estudado. Os problemas de otimização são normalmente relacionados à maximização ou minimização de uma função, que pode conter uma ou mais variáveis em um domínio específico (Antelo, 2011).

Um processo de separação é, na maioria das vezes, otimizado em escala de bancada e posteriormente suas condições de operação em escalas piloto e industrial podem ser projetadas e testadas. Quando se trata de processos cromatográficos, o aumento de escalas, também chamado *scale up*, é dado pelo aumento do volume e vazão da fase móvel (levando em consideração o tempo de separação da substância em estudo) da coluna cromatográfica, permitindo assim o processamento de maiores volumes de

solução com os mesmos níveis de desempenho obtidos nos processos em bancada (Barreto Jr., 2005).

Para otimização do processo de separação parâmetros básicos como a fase estacionária quiral e fase móvel adequadas para cada caso devem ser estudados, entretanto, a escolha correta das condições de operação, como a escolha da vazão da fase móvel e volume de injeção para experimentos em batelada, é outro fator indispensável. A determinação das condições ótimas de separação em laboratório é trabalhosa e assim outras técnicas, como o estudo de modelos matemáticos para representação dos fenômenos envolvidos, vêm sendo bastante utilizadas. Essa técnica apresenta grandes vantagens por resultar em economia de custo e tempo e, além disso, ótimos resultados (Cerutti, 2003; Barreto Jr., 2005).

Dentro deste contexto, a utilização de modelos matemáticos para a representação de processos químicos, tanto em escala laboratorial quanto industrial, 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).

Simulações de condições operacionais podem ser feitas a partir da modelagem de uma coluna cromatográfica, e daí pode-se chegar a um resultado previsto de condições ótimas para um processo. Em seguida, o resultado nessas condições pode ser testado experimentalmente e comparado com o resultado simulado, tendo suas discordâncias utilizadas na avaliação de variáveis que possam ter sido negligenciadas no desenvolvimento do modelo matemático ou na medida da significância dos parâmetros estimados (Barreto Jr., 2005).

2.4 Fármaco praziquantel e a separação de seus enantiômeros

2.4.1 Praziquantel

O praziquantel é um composto quiral que possui um centro quiral no carbono 11b (Figura 2.4), cujo nome químico é (±)-2ciclo-hexilcarbonil-1,2,3,6,7,11b-hexa-

hidro-4H-pirazino[2,1 -a]isoquinolin-4-ona (PZQ), é um anti-helmíntico de alto espectro utilizado no tratamento de todas as espécies conhecidas de esquistossomose, de numerosas espécies de cestódeos e trematódeos. Este medicamento é importante principalmente para o tratamento da esquistossomose, visto que antes dele não há registros de terapia segura e efetiva (Kelly *et al.*, 1993). Apresenta baixa solubilidade em água (0,4 mg/mL), o que aumenta as dificuldades na formulação farmacêutica de soluções orais, suspensões, granulados e injetáveis. Entretanto, é solúvel em etanol com solubilidade máxima em torno de 40 g/L, obtida neste trabalho, e facilmente solúvel em clorofórmio (F. Bras. IV, 1996).

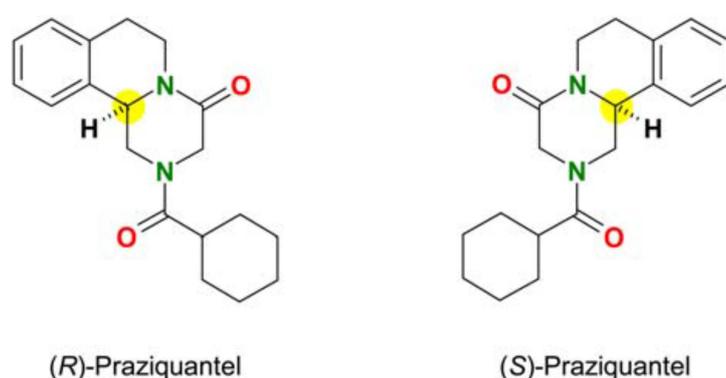


Figura 2.2 - Estrutura química do praziquantel.

No Brasil, atualmente, a mistura racêmica é importada pelo Ministério da saúde como um farmoquímico e formulada, porém sabe-se que o enantiômero (R)-PZQ é o que apresenta atividade anti-helmíntica, enquanto o (S)-PZQ é inefetivo (Liu & Stewart, 1997; Meyer *et al.*, 2009). Apesar de ambos os enantiômeros gerarem um efeito de bradicardia, somente o (S)-PZQ causa esse efeito em doses sub-terapêuticas (Kelly *et al.*, 1993).

Sabe-se ainda, segundo Meyer *et al.* (2009), que a formulação líquida baseada somente no (R)-PZQ apresenta sabor significativamente menos amargo que a formulação baseada na mistura racêmica. A partir dessas informações, pode-se dizer que a utilização do (R)-PZQ puro levaria à redução de metade da dose necessária nas formulações sólidas e as formulações líquidas apresentariam sabor menos amargo, fato este indispensável no uso do medicamento para o tratamento de crianças.

2.4.2 Separação dos enantiômeros do PZQ

A síntese da mistura racêmica do PZQ é um procedimento de baixo custo quando comparado à síntese enantioseletiva (Roszkowski *et al.*, 2006). Por este motivo, a mistura racêmica é mais utilizada em aplicações preparativas e industriais, o que leva ao uso da cromatografia quiral para obtenção de (R)-PZQ puro.

Diversos autores estudaram o uso da cromatografia quiral para a separação dos enantiômeros do PZQ. Kelly *et al.* (1993) estudaram a separação dos enantiômeros do PZQ no soro humano utilizando uma fase estacionária quiral baseada em um derivado de celulose, Chiralcel OD® (mesma fase estacionária quiral da coluna utilizada neste trabalho), e fase móvel consistindo em hexano e propanol em modo batelada e obtiveram uma separação adequada dos enantiômeros para a baixa quantidade em ng/mL desejada.

Lim e Ching (1996b) utilizaram fases estacionárias quirais baseadas em derivados de celulose, Chiralcel OD® e OJ®, e amilose, Chiralpak AD®, e como fase móvel misturas de hexano e propanol para a separação destes enantiômeros no modo batelada e não obtiveram alto potencial de discriminação, devido aos baixos valores de seletividade alcançados (na faixa de 1 a 1,1).

E ainda, Zhang *et al.* (2010) utilizou um seletor quiral derivado de celulose imobilizado em sílica, Chiralpak IC®, e água e acetonitrila como fase móvel para a separação dos enantiômeros do PZQ e obteve alto potencial de discriminação, porém o uso de solventes tóxicos não é aconselhado em aplicações farmacêuticas.

Quando se trata de unidades semi-contínuas e contínuas de operação existem estudos feitos em leito móvel simulado, o caso de Ching *et al.* (1993) e Kim e Ching (1996). Ching *et al.* (1993) desenvolveram um processo cromatográfico contínuo em escala preparativa dos enantiômeros do PZQ usando como fase estacionária o triacetato de celulose microcristalina (MCTA) e tendo metanol como fase móvel. Porém, o MCTA apresenta baixa estabilidade química e mecânica.

Lim e Ching (1996) alcançaram uma produtividade de 480 mg/h de mistura racêmica de PZQ processada com 97% de pureza para o (R)-PZQ e 97% de recuperação

deste enantiômero. O sistema utilizado por estes autores foi um LMS convencional com um arranjo de 8 colunas de MCTA.

Apesar do PZQ ter sido separado continuamente nas fases estacionárias mencionadas, como em MCTA, essas fases não vêm sendo mais utilizadas e novas fases estacionárias ainda não foram testadas com o medicamento em questão em processos contínuos, como o LMS e o processo Varicol.

2.5 Obtenção de parâmetros cromatográficos

Os parâmetros cromatográficos são úteis para avaliação e verificação da eficiência de separação de compostos na coluna cromatográfica. Esses parâmetros fornecem informações a respeito do comportamento do soluto entre a fase estacionária e a fase móvel (Schmidt-Traub, 2005). A determinação destes parâmetros requer uma sequência de experimentos que empregam soluções diluídas e concentradas.

Para sistemas que utilizam soluções diluídas, normalmente empregadas em separações analíticas, visa-se obter a melhor condição de separação. Sendo assim, são avaliadas a qualidade e eficiência de separação, com medidas de fatores de retenção, seletividade, resolução e número de pratos. Por outro lado, em sistemas com soluções concentradas, o objetivo é obter o máximo de material com alto grau de pureza no menor intervalo de tempo possível. Nesse caso os parâmetros de equilíbrio de adsorção não-lineares devem ser determinados e utilizados no projeto de condições operacionais de unidades preparativas em batelada como também para ampliação de escala para unidades contínuas.

2.5.1 Parâmetros analíticos de separação

Os parâmetros analíticos de separação são úteis para a avaliação e verificação da eficiência de separação na coluna cromatográfica (Sewell e Clarke, 1987).

O número de pratos é um dos parâmetros que caracteriza um sistema cromatográfico preparativo, é um parâmetro que indica a eficiência da coluna e pode ser dado pela Equação 2.1 (Schmidt-Traub, 2005).

$$N_i = 16 \left(\frac{t_{r,i}}{w_i} \right)^2 \quad (2.1)$$

em que N_i é o número de pratos teóricos do componente i , $t_{r,i}$ é o tempo de retenção do componente i em minutos e w_i é a largura do pico do componente i .

O fator de retenção, k_i , depende da distribuição do componente de interesse entre a fase móvel e a fase estacionária. É uma medida adimensional e de fundamental importância em separações cromatográficas e pode ser dado pela Equação 2.2 (Schmidt-Traub, 2005).

$$k_i = \frac{t_{r,i} - t_0}{t_0} \quad (2.2)$$

A relação entre os fatores de retenção do componente mais retido e do componente menos retido corresponde a outro parâmetro muito importante em cromatografia, e é chamado de fator de separação, Equação 2.3.

$$\alpha = \frac{k_j}{k_i} = \frac{t_{r,j} - t_0}{t_{r,i} - t_0} \quad (2.3)$$

A resolução cromatográfica, R_s , é uma medida de quão bem separados estão dois picos adjacentes que ocupam áreas similares. Altos valores de R_s significam que as substâncias estão mais separadas. De acordo com a literatura (Schmidt-Traub, 2005), valores de resolução acima de 1,5 significam que a separação entre os dois compostos ocorre até linha de base. A resolução pode ser dada pela Equação 2.4 (Schmidt-Traub, 2005).

$$R_s = (\alpha - 1) \left(\frac{k_i}{k_i + 1} \right) \frac{\sqrt{N_i}}{4} \quad (2.4)$$

em que o componente i neste caso é o componente menos retido.

2.6 Isotermas de equilíbrio de adsorção

A isoterma de adsorção é a informação mais importante para modelar processos de separação em cromatografia líquida (Seidel-Morgenstern e Guiochon, 1993; Schmidt-Traub, 2005) e descreve a distribuição de equilíbrio de um soluto entre as duas fases envolvidas no processo em uma faixa de concentração (Ruthven, 1984).

As isotermas de adsorção apresentam comportamento não linear sob condições de sobrecarga. As consequências do comportamento não linear nos perfis cromatográficos são bem conhecidas (Silva Jr., 2006; Silva Jr. et al., 2009; Seidel-Morgenstern, 1993; Guiochon et al., 2006). Sob fortes condições de sobrecarga, os picos de eluição dependem essencialmente da termodinâmica do equilíbrio de fases, apresentando forte assimetria dos picos cromatográficos e queda nos tempos de retenção, influenciado pela curvatura da isoterma de equilíbrio não-linear (Miyabe e Guiochon, 2000; Schmidt-Traub, 2005).

Quando se trata de cromatografia linear, os efeitos de dispersão axial e os processos de transferência de massa determinam o alargamento dos picos cromatográficos. Já na cromatografia preparativa, efeitos de transferência de massa e dispersão são geralmente menos importantes (Seidel-Morgenstern, 2004). Sendo assim, sabendo o comportamento da isoterma pode-se explicar o mecanismo de retenção e ajudar a propor rotas para melhorar a separação e, conseqüentemente, a taxa de produção; fato este que é de grande interesse quando se trata de separações enantioméricas (James et al., 1999).

Para modelagem e simulação de sistemas cromatográficos preparativos, os dados obtidos experimentalmente podem ser representados por equações matemáticas. A seguir serão mostrados os modelos mais utilizados de isoterma multicomponente.

2.6.1 Modelo Langmuir competitivo

O modelo de Langmuir competitivo faz as seguintes hipóteses:

- Todos os sítios de adsorção são considerados energeticamente iguais (superfície homogênea);
- Cada sítio de adsorção adsorve somente uma molécula de soluto;
- Uma única camada de moléculas de soluto adsorvido é formada;
- Não há interações laterais entre as moléculas adsorvidas.

Esse modelo é o mais utilizado quando se descreve adsorção não-linear, é conveniente para análise quantitativa de processos de adsorção e tem uma base física, diferentemente de equações empíricas, que não apresentam nenhuma justificativa

teórica (Guiochon *et al.*, 2006; Schmidt-Traub, 2005). A Equação 2.5 apresenta esse modelo.

$$q_i = \frac{a_i C_i}{1 + b_1 C_1 + b_2 C_2}; i = 1,2 \quad (2.5)$$

em que a_i e b_i são os coeficientes da isoterma de Langmuir para o componente i somente.

A grande vantagem desse modelo é a sua simplicidade, visto que há um pequeno número de parâmetros requeridos. Somente três parâmetros são requeridos para descrever a adsorção competitiva: duas constantes de equilíbrio e a capacidade de saturação (Cavazzini *et al.*, 2002).

2.6.2 Modelo bi-Langmuir competitivo

O Modelo bi-Langmuir competitivo assume que a superfície da FEQ contém dois tipos diferentes de sítios: sítios não seletivos, que retém ambos os enantiômeros com a mesma energia de adsorção, e sítios enantioseletivos, que interagem diferentemente com estes dois enantiômeros, ligando-se a eles com diferentes energias e com igual ou diferente capacidade da saturação. Sendo assim, nos sítios não seletivos as constantes de equilíbrio dos dois enantiômeros são iguais, fazendo com que este modelo contenha cinco parâmetros (Guiochon *et al.*, 2006). O modelo bi-Langmuir competitivo é dado pela Equação 2.6.

$$q_i = q_{ns} \frac{b_{ns,i} C_i}{1 + b_{ns,i} (C_1 + C_2)} + q_s \frac{b_{s,i} C_i}{1 + b_{s,i} C_1 + b_{s,2} C_2}; i = 1,2 \quad (2.6)$$

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 enantioseletivos, q_{ns} é a capacidade de saturação dos sítios não-seletivos e q_s é a capacidade de saturação dos sítios enantioseletivos.

2.6.3 Modelo Langmuir competitivo modificado

O modelo de Langmuir competitivo modificado é um caso particular do modelo de Langmuir competitivo e tem se mostrado adequado para descrever a adsorção em algumas fases estacionárias quirais (Zhang *et al.*, 2003). Este modelo é dado pela Equação 2.7.

$$q_i = h_i C_i + \frac{a_i C_i}{1 + b_1 C_1 + b_2 C_2}; i = 1,2 \quad (2.7)$$

em que h é a constante de equilíbrio linear para o componente i .

2.7 Métodos de determinação de isotermas de adsorção

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 utilizam informações no estado de equilíbrio, não analisam a curva concentração-tempo. Por outro lado, os métodos dinâmicos são baseados na análise matemática das curvas resposta que mostram as mudanças ocorridas na alimentação da coluna cromatográfica ao longo do tempo (Seidel-Morgenstern, 2004). Métodos dinâmicos são implementações dedicadas à cromatografia, esses métodos incluem a análise frontal (AF), análise frontal por pontos característicos (AFPC), eluição por pontos característicos (EPC), métodos de perturbação (MP), método de tempo de retenção (MTR) e método inverso (MI) (James *et al.*, 1999).

A Tabela 2.1, adaptada de Schmidt-Traub (2005) mostra os principais métodos, citados nesse texto, e resume suas principais características.

2.7.1 Análise frontal

A análise frontal consiste na alimentação da coluna pela solução do componente em estudo em uma concentração conhecida e constante até sua completa saturação. Ao atingir o equilíbrio, mudanças bruscas graduais de concentração crescente são alimentadas na coluna sucessivamente, gerando curvas de ruptura na forma de degraus

sucessivos. Cada curva de ruptura fornecerá um ponto na isoterma de adsorção competitiva (Guiochon *et al.*, 2006).

Tabela 2.1 – Principais métodos de determinação de isotermas de equilíbrio e suas características (Adaptado de Schmidt-Traub, 2005).

Nome	Comentários
Análise Frontal (AF)	<ul style="list-style-type: none"> • Alta precisão; • Fácil automatização; • Calibração do detector é necessária; • Grandes quantidades de amostra; • Pode ser utilizado para colunas de baixa eficiência; • Consome muito tempo.
Análise das frentes de dispersão (AFPC, EPC)	<ul style="list-style-type: none"> • Pequenas quantidades de amostra; • São necessárias colunas de alta eficiência; • Equilíbrio entre as fases é requerido; • Precisa calibração do detector se faz necessária.
Método de Perturbação	<ul style="list-style-type: none"> • Não é necessário calibração do detector; • É capaz de lidar com pequenas impurezas; • É necessário equilíbrio; • Pode lidar com colunas de baixa eficiência; • Modelos de isoterma necessários para calcular isotermas multicomponentes; • Tem potencial para automatização.
Método do Tempo de Retenção	<ul style="list-style-type: none"> • Necessita de pequenas quantidades de amostra; • Não é tão sensível a colunas de baixa eficiência quanto EPC e AFPC; • Não é necessária calibração do detector.
Método Inverso	<ul style="list-style-type: none"> • Modelo de coluna é necessário; • Modelo de isoterma é necessário;

-
- Parâmetros da isoterma têm de ser sensíveis.
-

O volume de injeção deve ser grande o suficiente para alcançar um platô de concentração, o que leva um determinado tempo. Durante esse período de adsorção, um novo equilíbrio é alcançado, com uma concentração na fase líquida sendo igual a concentração injetada posteriormente. Na etapa de dessorção o equilíbrio inicial é restaurado, com um atraso igual ao tempo de saturação da curva de ruptura antecedente. Esse procedimento experimental é de fácil implementação e automatizado, caso esteja disponível um sistema de entrega de gradiente (Schmidt-Traub, 2005).

A análise frontal é o método mais popular devido a sua alta precisão. Entretanto este modelo requer uma grande quantidade dos compostos estudados e consome muito tempo, pois este método demanda a coleta de vários pontos da isoterma, de modo a cobrir uma larga faixa de concentração (Felinger *et al.*, 2003).

2.7.2 Análise frontal por pontos característicos

O método de análise frontal por pontos característicos pode ser feito pelas medidas das isotermas de um componente puro a partir do limite traseiro obtido por análise frontal ou fazendo um degrau negativo de uma concentração finita para a fase móvel pura (Guiochon *et al.*, 2006).

Este método é dado pelo bombeamento na coluna de um largo degrau de concentração. Depois de alcançado o equilíbrio, e quando um platô estiver sendo eluído da coluna por um período de tempo suficientemente longo, a fase móvel pura é novamente bombeada na coluna. Um perfil difuso é obtido e a isoterma pode ser derivada a partir deste perfil (Seidel-Morgenstern, 2004).

2.7.3 Eluição por pontos característicos

Neste método a isoterma é derivada da parte traseira de um perfil de eluição de sobrecarga obtido pela injeção de uma amostra grande. Este método é bastante semelhante ao de análise frontal por pontos característicos. Aqui, a isoterma é determinada pela parte traseira de um perfil de eluição de sobrecarga, enquanto no anterior a isoterma é obtida pela parte traseira de uma banda retangular larga ou de um

perfil obtido na retirada do platô de concentração da coluna. Ambos os métodos são baseados na demonstração de que a velocidade pode ser associada com a concentração, e de que essa velocidade depende tão somente da concentração ao longo da isoterma (Guiochon *et al.*, 2006).

A principal desvantagem deste método é que a quantidade adsorvida é calculada por uma equação derivada do Modelo Ideal, assumindo assim que a eficiência da coluna é infinita. Por isso, este método deveria ser utilizado somente para colunas altamente eficientes, onde a contribuição do alargamento das bandas pode ser negligenciada. Além disso, os pontos experimentais próximos ao topo do perfil e os distribuídos ao longo da cauda, próximos a linha de base, são mais afetados por esta consideração do que os intermediários. Assim, podem-se produzir erros sistemáticos devido a dados imprecisos utilizados na determinação de pontos em altas concentrações na isoterma (Guiochon *et al.*, 2006; Schmidt-Traub, 2005).

2.7.4 Métodos de perturbação

Uma exigência para aplicação bem sucedida do método da perturbação é que as injeções realizadas sejam pequenas o suficiente para manter a coluna em equilíbrio. Se este for o caso, os tempos de retenção resultantes nas curvas resposta não irão depender do tipo da perturbação (Seidel-Morgenstern, 2004).

O princípio do método da perturbação é baseado em uma saturação da coluna passo a passo com diferentes soluções de concentrações conhecidas. Depois de alcançar o equilíbrio, pequenas amostras de diferentes concentrações são injetadas e os tempos de retenção correspondentes são medidos (Heuer *et al.*, 1998).

No tempo zero uma amostra analítica é injetada em uma coluna não carregada previamente. Em seguida a coluna é saturada com diferentes concentrações e pequenas amostras do eluente puro são injetadas de modo a perturbar o estado de equilíbrio (Heuer *et al.*, 1998).

Os tempos de retenção obtidos experimentalmente representam uma derivada total local das isotermas de adsorção, dq_i/dc_i . A partir da coleta de uma quantidade suficiente dessas derivadas, $q_i(c)$ pode ser determinada por integração (Guiochon *et al.*, 2006).

2.7.5 Método do tempo de retenção

Se a isoterma for do tipo Langmuir, a solução analítica do modelo ideal pode ser invertida e utilizada para obter os parâmetros da isoterma (Golshan-Shirazi & Guiochon, 1989). Uma injeção de pequena quantidade de amostra dá o tempo de retenção sob condições lineares, ou seja, proporcional à inclinação inicial da isoterma. Para uma isoterma de Langmuir, o perfil da banda de eluição apresenta uma frente muito inclinada, a qual o tempo de retenção é uma função somente do fator de carregamento, isto é, a razão entre o tamanho da amostra e a capacidade de saturação da coluna. O tempo de retenção de uma amostra grande permite a determinação do fator de carregamento correspondente, e assim, da capacidade de saturação (Guiochon *et al.*, 2006).

Este método é bastante conveniente para determinações rápidas de isotermas. Pode ser desenvolvido com pequenas quantidades do material estudado, sendo assim indicado para produtos de alto custo. Diferentemente de métodos bastante utilizados, como, por exemplo, o de eluição por pontos característicos, este método não necessita de calibração do detector, já que somente os tempos de retenção são medidos (Guiochon *et al.*, 2006).

2.7.6 Método Inverso

O método inverso de determinação de isotermas estima os parâmetros da isoterma a partir dos passos descritos a seguir. Primeiro, um modelo de isoterma é escolhido e estimativas iniciais são determinadas para os parâmetros desta isoterma. Essas estimativas iniciais podem ser ajudadas pelo resultado de injeções analíticas, porém pode-se utilizar outros métodos para essas estimativas iniciais como, por exemplo, o método do tempo de retenção (Fellinger *et al.*, 2003; Xu *et al.*, 2013).

Em seguida, perfis cromatográficos de sobrecarga são calculados com um modelo apropriado de cromatografia não linear. Os perfis cromatográficos medidos e calculados são comparados por meio de uma função objetivo. Finalmente, os

parâmetros da isoterma são modificados para minimizar essa função objetivo utilizando uma rotina de otimização (Guiochon *et al.*, 2006; Fellinger *et al.*, 2003).

2.8 Modelagem matemática de colunas cromatográficas

Modelar uma coluna cromatográfica significa associar equações matemáticas a cada fenômeno envolvido no processo. O comportamento de um sistema cromatográfico é governado por três fenômenos básicos (Schulte & Epping, 2005):

(1) a termodinâmica de adsorção, descrita pelas isotermas de equilíbrio de adsorção, que descrevem a concentração do soluto na fase estacionária e na fase móvel quando o equilíbrio é atingido, a uma dada temperatura. A capacidade de saturação de cada enantiômero para a FEQ utilizada pode ser obtida pela isoterma de adsorção;

(2) a hidrodinâmica da coluna, que descreve as propriedades do escoamento através do meio poroso;

(3) a transferência de massa, que seus diferentes mecanismos podem contribuir para o alargamento dos picos cromatográficos, o que resultam em uma menor eficiência de separação.

A utilização de modelos apropriados na descrição de processos adsorptivos possibilita a aplicação de uma determinada tecnologia em escala industrial a partir de uma escala laboratorial. Esses modelos facilitam a análise e o entendimento de dados experimentais, predizem respostas associadas a mudanças em condições operacionais e permitem sua otimização (Wang *et al.*, 2008).

Sendo assim, vários modelos vêm sendo discutidos na literatura (Guiochon, 2002; Fellinger *et al.*, 2003; Javeed *et al.*, 2013), é o caso do modelo geral, modelo do transporte dispersivo, modelo do equilíbrio dispersivo e o modelo ideal. Esses modelos matemáticos representam os processos cromatográficos por meio de balanços de massa e o número de parâmetros exigidos aumenta de acordo com a complexidade do mesmo.

2.8.1 Modelo Geral

O modelo geral considera simultaneamente todas as possíveis contribuições da cinética de transferência de massa que estão envolvidas na cromatografia. Isso é feito pela contribuição desses parâmetros no sistema de equações diferenciais parciais que descrevem a conservação e o transporte de massa (Guiochon *et al.*, 2002). Para escrever as equações matemáticas deste modelo assume-se que:

- Processo em leito fixo é isotérmico;
- Velocidade da fase móvel é constante;
- O leito é empacotado com partículas de adsorventes porosas, esféricas e de tamanhos uniformes;
- O gradiente de concentração na direção radial do leito é desprezível;
- Existe um equilíbrio local para cada componente entre a superfície porosa e a estagnada nos microporos;
- O coeficiente de dispersão axial é constante;
- A difusão no interior das partículas é representada pela difusão nos poros;
- O parâmetro de transferência de massa no filme (externo a partícula) descreve a transferência de massa da fase fluida para os poros.

O Modelo Geral considera separadamente a transferência de massa interna e externa partícula, devido a isso são necessários dois balanços de massa: um para a fase móvel que flui entre as partículas de adsorvente e um para a fase estacionária (Guiochon *et al.*, 2006).

O balanço na fase móvel é dado pela Equação 2.8.

$$\varepsilon \frac{\partial C_{i,j}}{\partial t} + u \frac{\partial C_{i,j}}{\partial z} = \varepsilon D_L \frac{\partial^2 C_{i,j}}{\partial z^2} - (1 - \varepsilon) k_{f,i,j} a_p (C_{i,j} - C_{p,i,j} |_{r=R_p}) \quad (2.8)$$

em que C e C_p são as concentrações do componente i na fase fluida e na fase fluida estagnada nos poros das partículas na coluna j , ε a porosidade do leito, D_L corresponde ao coeficiente de dispersão axial, u é a velocidade superficial da fase móvel, k_f é o coeficiente de transferência de massa externo; a_p é a área da superfície externa das partículas adsorventes; r é a coordenada radial e R_p é o raio da partícula; z e t são as coordenadas espaciais e de tempo, respectivamente.

Já o balanço na fase sólida é dado pela Equação 2.9.

$$\varepsilon_p \frac{\partial C_{p,i,j}}{\partial t} + (1 - \varepsilon_p) \frac{\partial q_i}{\partial t} = D_p \frac{1}{r^2} \frac{\partial}{\partial r} \left(r^2 \frac{\partial C_{p,i,j}}{\partial r} \right) \quad (2.9)$$

em que ε_p é a porosidade das partículas; q é a concentração do componente i na fase sólida e D_p é o coeficiente de difusão no poro.

2.8.2 Modelo do transporte dispersivo

O modelo do transporte dispersivo consiste em uma equação diferencial parcial para a fase líquida acoplada a uma equação diferencial ordinária que descreve a transferência de massa na partícula, usando o conceito de força motriz linear no sólido. Esse modelo é utilizado nos casos em que a transferência de massa não pode ser negligenciada e todos os mecanismos de transferência de massa no interior das partículas são agrupados no coeficiente global k_m (Guiochon *et al.*, 2006). Os balanços na fase móvel e na fase sólida são dados pelas Equações 2.10 e 2.11, respectivamente.

$$\frac{\partial C_{i,j}}{\partial t} + \frac{(1 - \varepsilon)}{\varepsilon} \frac{\partial q_{i,j}}{\partial t} + u \frac{\partial C_{i,j}}{\partial z} = D_L \frac{\partial^2 C_{i,j}}{\partial z^2} \quad (2.10)$$

$$\frac{\partial q_{i,j}}{\partial t} = k_m (q_{i,j}^* - q_{i,j}) \quad (2.11)$$

em que q^* é a quantidade adsorvida do componente i na coluna j em equilíbrio com a concentração C na fase móvel, que é fornecida pela equação da isoterma de equilíbrio) e q é a concentração média nas partículas.

2.8.3 Modelo do equilíbrio dispersivo

O modelo do equilíbrio dispersivo assume que a transferência de massa ao longo da coluna é infinitamente rápida, mas leva em consideração a dispersão axial. Por assumir que a transferência ocorre de forma instantânea e que as resistências à transferência de massa podem ser representadas em um único coeficiente de dispersão aparente (D_{ap}), não é indicado em sistemas nos quais a eficiência da coluna é baixa (Guiochon, 2002). As Equações 2.12 e 2.13 descrevem este modelo.

$$\frac{\partial C_{i,j}}{\partial t} + \frac{(1 - \varepsilon)}{\varepsilon} \frac{\partial q_{i,j}}{\partial t} + u \frac{\partial C_{i,j}}{\partial z} = D_{ap} \frac{\partial^2 C_{i,j}}{\partial z^2} \quad (2.12)$$

$$D_{ap} = \frac{Lu}{2N_p} \quad (2.13)$$

2.8.4 Modelo Ideal

O modelo ideal considera que a coluna tem uma eficiência infinita, isto é, a taxa de transferência de massa entre a fase estacionária e a fase móvel é alta e não há efeitos de dispersão axial. Sendo assim o perfil cromatográfico resultante depende somente das características do equilíbrio termodinâmico. Esse modelo tem a vantagem da simplicidade e de prever os melhores resultados possíveis. Todos os outros modelos são não ideais e utilizam diferentes maneiras de consideração da eficiência finita da coluna (Guiochon, 2002). O balanço de massa é dado pela Equação 2.14.

$$\frac{\partial C_i}{\partial t} + \frac{(1 - \varepsilon)}{\varepsilon} \frac{\partial q_i}{\partial t} + u \frac{\partial C_i}{\partial z} = 0 \quad (2.14)$$

3. Materiais e Métodos

3.1 Materiais

3.1.1 Praziquantel

Para realização deste trabalho foi utilizada mistura racêmica do fármaco Praziquantel, gentilmente fornecida pelo Laboratório de Sistemas Farmacêuticos Avançados da Fundação Oswaldo Cruz (LaSiFA/FIOCRUZ) (Rio de Janeiro, RJ).

3.1.2 A coluna quiral

A coluna cromatográfica utilizada é constituída da fase estacionária quiral (FEQ) celulose tris(3-cloro-4- metilfenilcarbamato) (Figura 3.1), comercialmente conhecida como Lux Celulose-2 (Phenomenex, USA), tendo 250 mm de comprimento e 4,6 mm de diâmetro interno. A FEQ empregada neste estudo tem tamanho de partícula de 5 µm de diâmetro e 100 nm de diâmetro médio de poro, segundo informações do fabricante.

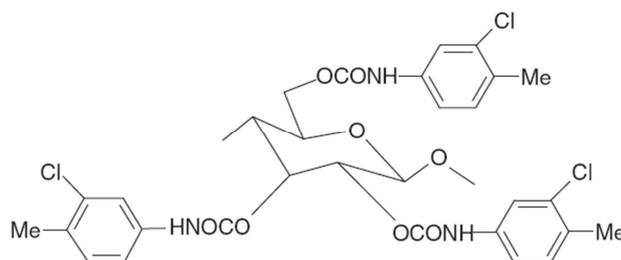


Figura 3.1 – Estrutura química da FEQ utilizada – celulose tris(3-cloro-4-metilfenilcarbamato).

3.1.3 Aparelhagem Experimental

Todos os experimentos cromatográficos foram realizados em um sistema de CLAE (cromatografia líquida de alta eficiência) equipado com duas bombas Shimadzu modelo LC – 20AT, equipado com controle de temperatura (temperatura de trabalho igual a 25°C), detector UV/Vis Shimadzu modelo SPD – 20AV e sistema de aquisição de dados computadorizado (software LC Solution). A Figura 3.2 apresenta o sistema de CLAE utilizado na realização dos experimentos.

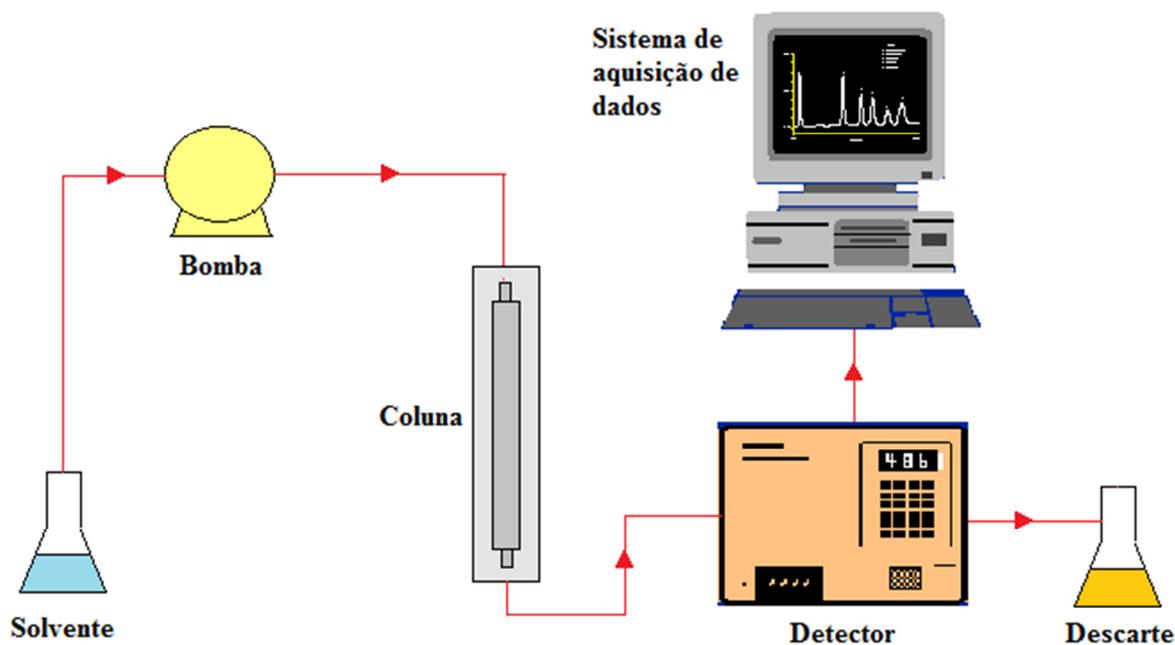


Figura 3.2 - Diagrama esquemático do sistema de CLAE utilizado na realização dos experimentos.

Todos os experimentos realizados utilizaram etanol (grau CLAE) como fase móvel, adquirido da J. T. Baker (USA), seguindo experimentos preliminares de Hoffmeister *et al.* (2010).

3.2 Métodos

3.2.1 Experimentos com soluções diluídas

Foram preparadas soluções da mistura racêmica de PZQ em etanol anidro na concentração de 1g/L. Experimentos baseados na resposta da coluna Lux celulose-2 a pulsos da solução de PZQ foram realizados variando-se as vazões da fase móvel (0,5, 1 e 2 mL/min) e o volume de solução injetado (20, 60 e 100 μ L). As injeções foram realizadas após um intervalo de tempo necessário para a estabilização do sistema cromatográfico com a fase móvel em modo isocrático. Em todos os experimentos a temperatura foi mantida constante a 25°C e as respostas aos pulsos foram monitoradas pelo detector UV em um comprimento de onda de 210 nm, já que este foi previamente escolhido para a separação proposta no trabalho de Hoffmeister *et al.* (2010).

Tanto a solução de PZQ quanto a fase móvel foram filtradas em sistema de filtração Millipore (membranas 0,45 µm) e desgaseificadas em banho ultrassônico antes de sua utilização no sistema de CLAE.

3.2.1.1 Obtenção da porosidade total

Para determinação da porosidade total, pequenos pulsos cromatográficos (10µL e 20µL) de 1,0 g/L de tri-*terc*-butilbenzeno (TTBB) foram injetados a 0,5mL/min e a temperatura de 25°C. Nesses experimentos a fase móvel utilizada também foi etanol e a solução de TTBB foi preparada com metanol. As respostas foram monitoradas pelo detector UV no qual foi fixado o comprimento de onda em 240 nm.

A partir do ensaio cromatográfico com injeção de solução de TTBB obteve-se o tempo de substância não retida e pela Equação 3.1 foi possível obter a porosidade total.

$$\varepsilon = \frac{t_0 Q}{V_C} \quad (3.1)$$

em que ε é a porosidade total, t_0 é o tempo de passagem da substância não retida em minutos, Q é a vazão em mL/min e V_C é o volume da coluna cromatográfica em mL.

3.2.1.2 Obtenção dos parâmetros analíticos de separação

Para a obtenção do número de pratos teóricos foi utilizada a Equação 2.1 deste trabalho e foi levada em consideração somente a menor concentração estudada, 1g/L, no menor volume de injeção, 20µL. Isso porque faz sentido falar em número de pratos no caso de separações analíticas, onde pequenas quantidades de soluto são injetadas na coluna, sendo assim, a condição que mais se aproxima de uma diluição infinita seria a de menor quantidade de soluto na coluna.

Ainda a partir dos experimentos com soluções diluídas foram determinados o fator de retenção, a seletividade e a resolução cromatográfica, cujas equações foram descritas no Capítulo 2.

3.2.1.3 Identificação dos tempos de retenção

A identificação dos tempos de retenção foi feita pelo primeiro momento absoluto, μ_t , expresso pela Equação 3.2 (Ruthven, 1984; Schmidt-Traub, 2005).

$$\mu_t = \frac{\int_0^{\infty} tc(t)dt}{\int_0^{\infty} c(t)dt} \quad (3.2)$$

O cálculo do primeiro momento absoluto foi feito a partir da integração numérica dos picos cromatográficos.

3.2.2 Experimentos com soluções concentradas

Para os experimentos com soluções concentradas foram preparadas soluções da mistura racêmica de PZQ em etanol anidro nas concentrações de 5, 10, 15 e 20 g/L para avaliar comportamento de sobrecarga de concentração e 40g/L para avaliar até que volume de injeção ocorreria separação por linha de base.

Novamente, tanto as soluções de PZQ quanto a fase móvel foram filtradas em sistema de filtração Millipore (membranas 0,45 μm) e desgaseificadas em banho ultrassônico antes de sua utilização no sistema de CLAE.

A Tabela 3.1 apresenta um resumo das condições experimentais realizadas e a quantidade de praziquantel racêmico injetada em cada situação.

Experimentos de sobrecarga foram realizados com o intuito de avaliar o comportamento dos perfis em condições não-lineares. Com objetivo de avaliar os perfis cromatográficos nas diferentes concentrações estudadas (5, 10, 15 e 20g/L), foram introduzidos na coluna pulsos cromatográficos a diferentes volumes de injeção (20, 60 e 100 μL) e diferentes vazões da fase móvel (0,5, 1 e 2mL/min). Neste passo foram feitas três réplicas no ponto central (10g/L, 1mL/min e 60 μL).

Com intuito de avaliar até onde ocorreria separação por linha de base foi realizado um conjunto de experimentos, com amostras de 40 g/L da solução da mistura racêmica de PZQ sendo injetadas na coluna variando-se o volume de injeção (100, 140, 180 e 250 μL) e com vazão mantida de 1 mL/min. Em todos os experimentos

cromatográficos o comprimento de onda foi de 210 nm e a temperatura constante a 25°C.

Tabela 3.1 - Matriz das condições experimentais nas quais os experimentos foram realizadas e quantidade de PZQ injetado em cada uma delas.

Soluções diluídas								
1 g/L								
0, 5 mL/min			1 mL/min			2 mL/min		
20 µL	60 µL	100 µL	20 µL	60 µL	100 µL	20 µL	60 µL	100 µL
0,02 mg	0,06 mg	0,1 mg	0,02 mg	0,06 mg	0,1 mg	0,02 mg	0,06 mg	0,1 mg
Soluções concentradas								
5 g/L								
0, 5 mL/min			1 mL/min			2 mL/min		
20 µL	60 µL	100 µL	20 µL	60 µL	100 µL	20 µL	60 µL	100 µL
0,1 mg	0,3 mg	0,5 mg	0,1 mg	0,3 mg	0,5 mg	0,1 mg	0,3 mg	0,5 mg
10 g/L								
0, 5 mL/min			1 mL/min			2 mL/min		
20 µL	60 µL	100 µL	20 µL	60 µL	100 µL	20 µL	60 µL	100 µL
0,2 mg	0,6 mg	1 mg	0,2 mg	0,6 mg	1 mg	0,2 mg	0,6 mg	1 mg
15 g/L								
0, 5 mL/min			1 mL/min			2 mL/min		
20 µL	60 µL	100 µL	20 µL	60 µL	100 µL	20 µL	60 µL	100 µL
0,3 mg	0,9 mg	1,5 mg	0,3 mg	0,9 mg	1,5 mg	0,3 mg	0,9 mg	1,5 mg
20 g/L								
0, 5 mL/min			1 mL/min			2 mL/min		
20 µL	60 µL	100 µL	20 µL	60 µL	100 µL	20 µL	60 µL	100 µL
0,4 mg	1,2 mg	2 mg	0,4 mg	1,2 mg	2 mg	0,4 mg	1,2 mg	2 mg
40 g/L								
1 mL/min								
100 µL			140 µL			180 µL		
4 mg			5,6 mg			7,2 mg		
						250 µL		
						10 mg		

3.2.3 Obtenção dos parâmetros da isoterma de Langmuir competitivo

A obtenção dos parâmetros da isoterma de adsorção foi através de procedimento descrito pelo caso de eluição de um pulso de injeção retangular em Guiochon (2006), o

qual utiliza uma solução analítica do Modelo Ideal e isoterma de Langmuir competitiva e posteriormente se faz uma minimização dos parâmetros.

O método utilizado aqui caracteriza um método híbrido entre o método dos tempos de retenção e o método inverso. Visto que se utiliza uma solução analítica do modelo ideal, o que caracteriza o método dos tempos de retenção, porém utiliza-se também um procedimento de regressão, que caracteriza o método inverso. Vale salientar que este procedimento não envolve o uso de uma solução numérica, que para um sistema predominantemente convectivo é muito custosa computacionalmente.

A partir das equações mostradas abaixo se chegou a valores calculados de tempos de retenção de frente de massa, tempos estes que são dependentes dos parâmetros da isoterma, os quais foram obtidos por meio de minimização de uma função objetivo no @Excel, utilizando as Equações 3.3 a 3.11.

O tempo de retenção da frente de massa do componente l foi obtido pela Equação 3.3:

$$t_{R,l} = t_0 \left[1 + \frac{F a_l}{1 + b_l C_l^A} \right] \quad (3.3)$$

em que $t_{R,l}$ é o tempo de retenção da frente de massa do componente l , t_0 é o tempo morto, F é a razão das fases dada por $(1-\varepsilon)/\varepsilon$, a_l e b_l são parâmetros da isoterma de Langmuir competitivo e C_l^A é a concentração do primeiro componente na frente de massa.

$$C_1^A = C_1^0 - r_2 C_2^0 \quad (3.4)$$

em que C_1^0 e C_2^0 são as concentrações iniciais dos componentes 1 e 2 , respectivamente e r_2 é a raiz negativa de uma equação obtida a partir da relação entre as concentrações C_1 e C_2 , a qual define quais pares de concentração podem coexistir em uma separação. A dedução da Equação 3.5 está em Guichon (2006) e foi mostrada no Apêndice.

$$\alpha' b_1 C_2^0 r^2 - (\alpha' - 1 + \alpha' b_1 C_1^0 - b_2 C_2^0) r - b_2 C_1^0 = 0 \quad (3.5)$$

$$r_2 = - \frac{b_2 C_1^0}{\alpha b_1 C_2^0 r_1} \quad (3.6)$$

em que α' é o fator de separação, dado pela razão entre os coeficientes a_2 e a_1 da isoterma de Langmuir competitivo e r_1 é a raiz positiva da equação mencionada anteriormente obtida pela Equação 3.7.

$$r_1 = \frac{\alpha - 1 + \alpha b_1 C_1^0 - b_2 C_2^0 + \sqrt{(\alpha - 1 + \alpha b_1 C_1^0 - b_2 C_2^0)^2 + 4\alpha b_1 b_2 C_1^0 C_2^0}}{2\alpha b_1 C_2^0} \quad (3.7)$$

O tempo de retenção da frente de massa do componente 2 pode ser obtido pela Equação 3.8.

$$t_{R,2} = t_p + t_0 \left[1 + F a_2 \gamma (1 - \sqrt{L'_f})^2 \right] \quad (3.8)$$

em que $t_{R,2}$ é o tempo de retenção da frente de massa do componente 2, t_p é a duração de um pulso de injeção retangular (Equação 3.9), γ é uma variável auxiliar (Equação 3.10) e L'_f é um fator que caracteriza a sobrecarga da coluna (Equação 3.11).

$$t_p = \frac{V_{inj}}{Q} \quad (3.9)$$

em que V_{inj} é o volume de solução injetado e Q é a vazão da fase móvel.

$$\gamma = \frac{\alpha b_1 r_1 + b_2}{b_1 r_1 + b_2} \quad (3.10)$$

$$L'_f = t_p \frac{b_1 C_1^0 + b_2 C_2^0 + (\gamma - 1)/\gamma}{t_{R,2}^0 - t_0} \quad (3.11)$$

em que $t_{R,2}^0$ é o tempo de retenção de frente de massa de uma concentração igual a zero do primeiro componente, dado pela Equação 3.12.

$$t_{R,2}^0 = t_0 (1 + F a_2) \quad (3.12)$$

Para se obter valores de $t_{R,1}$ e $t_{R,2}$, foram feitas estimativas iniciais para os parâmetros a_1 , a_2 , b_1 e b_2 da isoterma de Langmuir competitiva e se chegou aos valores finais a partir da minimização de uma função objetivo pelo método de otimização GRG – gradiente reduzido generalizado, que é dada pela Equação 3.13.

$$F.O. = (t_{R,1 exp} - t_{R,1 calc})^2 + (t_{R,2 exp} - t_{R,2 calc})^2 \quad (3.13)$$

A função objetivo foi baseada nos tempos de retenção de frente de massa calculados e nos obtidos experimentalmente. Aqui foram levados em consideração os experimentos com as soluções de PZQ de 5, 10, 15 e 20 g/L, com vazões da fase móvel de 0,5, 1 e 2 mL/min e volumes de injeção de 20, 60 e 100 μ L, totalizando 36 experimentos.

3.2.4 Simulação utilizando o Modelo do equilíbrio dispersivo

Efeitos de transferência de massa e de dispersão axial são em geral pouco importantes em cromatografia preparativa de alta eficiência, e algumas vezes pode-se negligenciá-los completamente (Seidel-Morgenstern, 2004). Por esta razão, aliado à vantagem de ser um modelo simples, escolheu-se fazer a simulação baseada neste modelo.

O modelo do equilíbrio dispersivo assume que todas as contribuições do não equilíbrio podem ser agrupadas em um termo de dispersão aparente. Assume também que os coeficientes de dispersão aparente dos solutos permanecem constantes, independente da concentração dos compostos na amostra (Guiochon, 2002).

Este modelo é correto somente se a transferência de massa na coluna cromatográfica for controlada pela difusão molecular através da fase móvel que flui pelas partículas empacotadas e se a transferência dos compostos injetados entre as fases estacionária e móvel ocorra instantaneamente. Normalmente, o que se faz é uma aproximação, que pode ser considerada excelente devido as altas eficiências alcançadas nas colunas cromatográficas modernas.

Na Equação 3.14 está mostrado o balanço de massa para ambos os componentes.

$$\frac{\partial C_i}{\partial t} + \frac{(1 - \varepsilon)}{\varepsilon} \frac{\partial q_i}{\partial t} + u \frac{\partial C_i}{\partial z} = D_{ap,i} \frac{\partial^2 C_i}{\partial z^2} \quad (3.14)$$

em que C_i é a concentração do componente i na fase móvel, q_i é a concentração do componente i na fase estacionária, ε é a porosidade total, $D_{ap,i}$ é o coeficiente de dispersão aparente dado pela Equação 3.15, u é a velocidade intersticial e t e z são as coordenadas temporal e espacial, respectivamente.

$$D_{ap,i} = \frac{Lu}{2N_{p,i}} \quad (3.15)$$

em que L é o comprimento da coluna cromatográfica e $N_{p,i}$ é o número de pratos.

A concentração do componente i na fase estacionária, q_i , é descrita pela equação da isoterma de Langmuir competitiva neste caso, a qual é mostrada na Equação 3.16.

$$q_i = \frac{a_i C_i}{1 + b_1 C_1 + b_2 C_2} \quad (3.16)$$

em que a_i , b_1 e b_2 são os coeficientes da isoterma de Langmuir para o componente $i = 1, 2$.

A condição inicial (Equação 3.17) e de contorno (Equações 3.18, 3.19 e 3.20) para solução da Equação 3.18 são mostradas abaixo.

$$C_i(t = 0, 0 \leq z \leq L) = 0 \quad (3.17)$$

Condição limite na entrada da coluna ($t > 0$ e $z = 0$):

$$C_i(t < t_p, z = 0) = C_1^0 \quad (3.18)$$

$$C_i(t > t_p, z = 0) = 0 \quad (3.19)$$

Já a condição limite para a saída da coluna ($t > 0$ e $z = L$):

$$\left. \frac{\partial C_i}{\partial z} \right|_{z=L} = 0 \quad (3.20)$$

em que C_1^0 é a concentração inicial do componente 1 e t_p é a duração de um pulso de injeção retangular.

Após obtenção dos parâmetros da isoterma, o próximo passo foi a simulação dos casos estudados a partir da solução da equação 3.14 implementada no software ©Compaq Visual Fortran 6.6, este programa foi desenvolvido na linguagem Fortran por Amaro Gomes Barreto Júnior. A solução deste sistema foi baseada no método das linhas, no qual a coordenada axial foi discretizada por aproximações parabólicas em elementos finitos. Esta etapa do trabalho foi realizada de maneira a testar uma ferramenta de predição do comportamento da coluna.

A implementação do programa teve como constantes a porosidade total, o diâmetro, a área da seção, o volume e o comprimento da coluna cromatográfica. Os parâmetros de entrada foram os parâmetros da isoterma, os números de pratos para os componentes 1 e 2 e as condições de operação: o volume injetado, a vazão da fase móvel e a concentração de alimentação, que foram colocados no arquivo de entrada `entradar.dat`.

O programa soluciona o sistema de equações parciais, utilizando para isto a isoterma de Langmuir competitiva. As equações foram discretizadas na variável axial, z , e integradas na variável tempo, t . As equações algébrico-diferenciais resultantes foram integradas empregando o método *Backward Differentiation Formulae* (BDF), a partir da utilização do pacote computacional Dassl.

Os dados de saída são apresentados no arquivo *interm.dat*, que contém sete colunas: tempo, concentração dos componentes 1 e 2 na saída da coluna, a soma das concentrações de ambos os componentes, as áreas dos picos cromatográficos dos componentes 1 e 2 em um dado instante e a soma das áreas de ambos os componentes.

4. Resultados e Discussão

4.1 Determinação da porosidade total

A partir da injeção do composto TTBB foi obtido um tempo de retenção do componente inerte igual a 6,8 min para a vazão de 1 mL/min. Este tempo de retenção é curto quando comparado aos obtidos para a mesma vazão da fase móvel (1mL/min), isso é devido ao composto ser inerte e por isso não ocorre interação com a coluna. Assim, utilizando a Equação 3.1 obteve-se uma porosidade total de $\varepsilon = 0,68$ (Cromatogramas para o TTBB estão nas Figuras A e B dos anexos).

4.2 Análise dos perfis de eluição da solução diluída de PZQ

As Figuras 4.1 a 4.6 mostram os perfis de eluição do praziquantel racêmico a diferentes volumes de injeção e vazões da fase móvel, todos a temperatura de 25°C e fase móvel etanol anidro. Em todas essas figuras pode-se perceber uma completa separação dos enantiômeros do praziquantel ocorrendo até a linha de base. Acredita-se que essa separação ocorra devido a interações estéricas que ocorrem entre os enantiômeros e a FEQ resultando em mecanismos de retenção que promovem sua separação (Schmidt-Traub, 2005).

Analisando primeiramente as Figuras 4.1, 4.2 e 4.3, onde foram comparados os perfis cromatográficos a uma mesma vazão e com variação do volume de injeção, percebe-se que conforme se aumenta o volume de injeção ocorre um decréscimo do tempo de retenção e um alargamento dos picos. Este comportamento era o esperado, visto que com o aumento do volume de injeção para uma determinada concentração, maior a quantidade de soluto injetada na coluna, fazendo com que mais moléculas de soluto disputem por um sítio de adsorção disponível, reduzindo assim o tempo de retenção.

Percebe-se ainda que em todas as Figuras mostradas aparece um primeiro pico que não corresponde a nenhum dos enantiômeros do PZQ. Acredita-se que este pico seja resultado de impurezas presentes no material, visto que no ensaio realizado com a substância inerte, TTBB, não ocorre a presença deste pico.

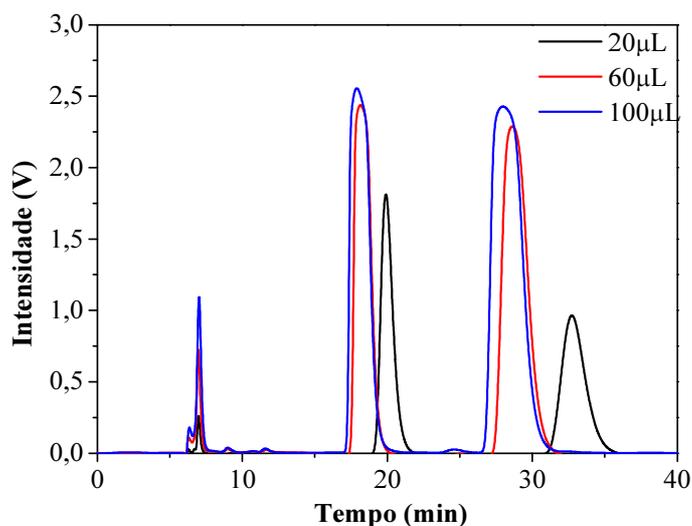


Figura 4.1 – Comparação dos perfis cromatográficos da solução de PZQ. Concentração: 1 g/L; vazão da fase móvel: 0,5 mL/min; volume de injeção: 20, 60 e 100 μ L; fase móvel: etanol; temperatura: 25°C; comprimento de onda: 210 nm.

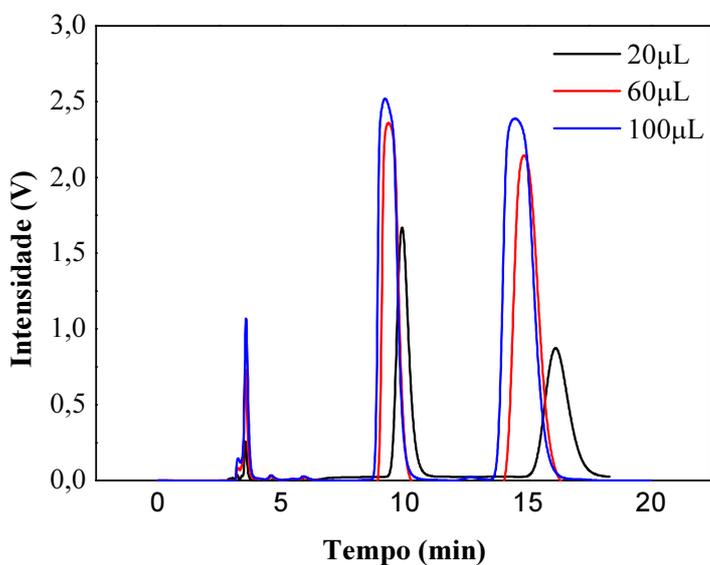


Figura 4.2 - Comparação dos perfis cromatográficos da solução de PZQ. Concentração: 1 g/L; vazão da fase móvel: 1 mL/min; volume de injeção: 20, 60 e 100 μ L; fase móvel: etanol; temperatura: 25°C; comprimento de onda: 210 nm.

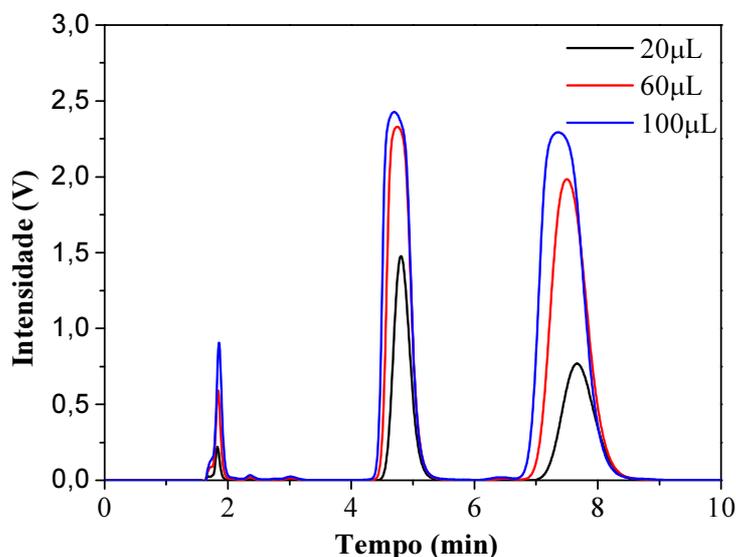


Figura 4.3 - Comparação dos perfis cromatográficos da solução de PZQ. Concentração: 1 g/L; vazão da fase móvel: 2 mL/min; volume de injeção: 20, 60 e 100 μ L; fase móvel: etanol; temperatura: 25°C; comprimento de onda: 210 nm.

Nas Figuras 4.4, 4.5 e 4.6 está sendo avaliada a influência da vazão da fase móvel nos perfis cromatográficos para um mesmo volume de injeção. Percebe-se que com o aumento da vazão ocorre uma aproximação entre os picos, porém a separação continua acontecendo até a linha de base.

Com o aumento da vazão da fase móvel o tempo de contato entre as fases móvel e estacionária diminuem, fazendo com que o tempo de contato entre o soluto e a fase estacionária seja menor, por isso a aproximação entre os picos.

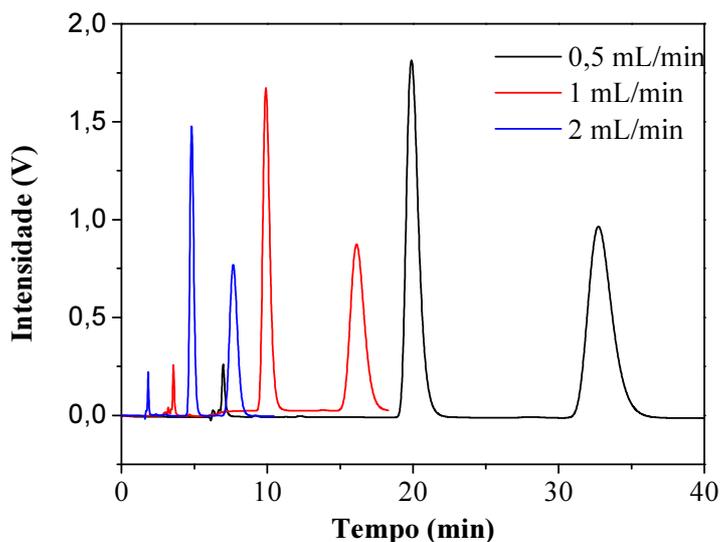


Figura 4.4 - Comparação dos perfis cromatográficos da solução de PZQ. Concentração: 1 g/L; vazão da fase móvel: 0,5, 1 e 2 mL/min; volume de injeção: 20 µL; fase móvel: etanol; temperatura: 25°C; comprimento de onda: 210 nm.

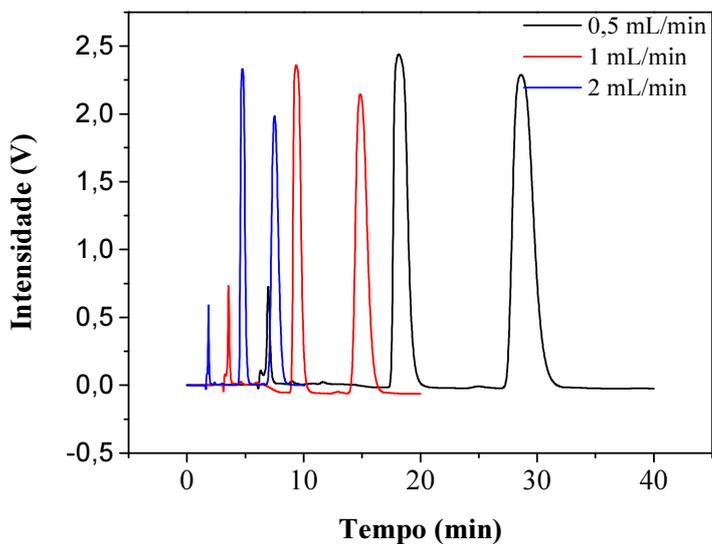


Figura 4.5 - Comparação dos perfis cromatográficos da solução de PZQ. Concentração: 1 g/L; vazão da fase móvel: 0,5, 1 e 2 mL/min; volume de injeção: 60 µL; fase móvel: etanol; temperatura: 25°C; comprimento de onda: 210 nm.

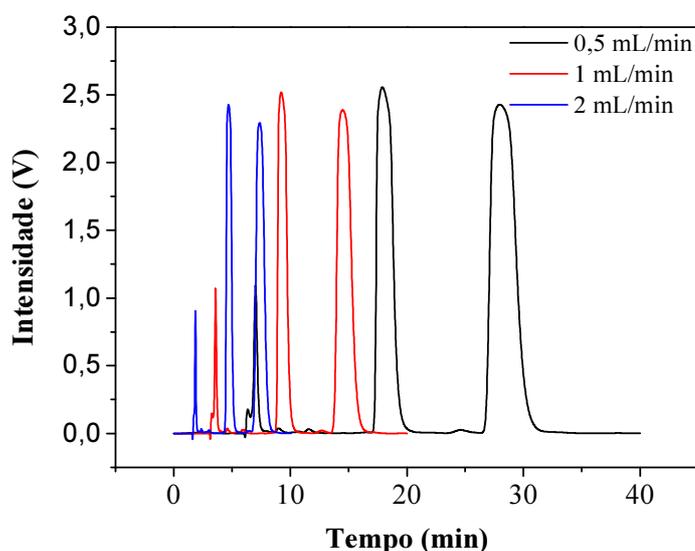


Figura 4.6 - Comparação dos perfis cromatográficos da solução de PZQ. Concentração: 1 g/L; vazão da fase móvel: 0,5, 1 e 2 mL/min; volume de injeção: 100 μ L; fase móvel: etanol; temperatura: 25°C; comprimento de onda: 210 nm.

4.3 Análise dos parâmetros analíticos de separação

Na Tabela 4.1 são mostrados os parâmetros analíticos de separação do praziquantel na coluna Lux celulose-2 nas diferentes vazões estudadas e para o menor volume de injeção estudado (20 μ L), já que nesta fase queremos avaliar a eficiência da coluna para a separação.

Pode-se perceber que o número de pratos teóricos diminui com o aumento da vazão da fase móvel. Quanto mais largo for o pico e menor os tempos de retenção, menor será a eficiência de separação, resultando assim em um menor número de pratos. Porém, em todos os casos o número de pratos teóricos indica uma boa eficiência da coluna para a separação proposta.

Os valores de fator de retenção foram maiores que um para ambos os enantiômeros sob as condições estudadas e a seletividade obtida em torno de 1,87 pela Equação 2.3, revelando uma boa separação.

Emerick *et al.* (2012) estudaram a separação de *metamidophos*, um pesticida quiral, em uma coluna Chiralcel OD® constituída de FEQ celulose tris(3,5)dimetilfenilcarbamato, utilizando vazão de 3 mL/min e 50 µL de volume de injeção e obteve fator de retenção na ordem de 3 e seletividades na ordem de 1, indicando que para o composto quiral estudado a FEQ não foi satisfatória para a separação.

Chen *et al.* (2003) estudaram a separação de vários compostos, entre eles o praziquantel, em colunas com FEQ constituída de celulose tris-fenilcarbamato e celulose tris(4-metilbenzoato), utilizando como fase móvel uma mistura de hexano, etanol e ácido fórmico a uma vazão de 0,6 mL/min e obteve fatores de retenção e seletividade na ordem de 7,40 e 1,22 para a FEQ de celulose tris-fenilcarbamato e 1,19 e 1,08 para a FEQ celulose tris(4-metilbenzoato).

Zhang *et al.* (2010) alcançou fator de seletividade da ordem de 2,5, usando um seletor quiral derivado de celulose imobilizado em sílica (Chiralpak IC®) e água e acetonitrila (20:80) como fase móvel para separação dos enantiômeros do PZQ. Entretanto, o uso de solventes tóxicos na separação do princípio ativo é desaconselhada para aplicação farmacêutica.

Já para os valores de resolução percebemos o mesmo comportamento do número de pratos, ela diminui com o aumento da vazão, isso se deve ao fato de que vazões maiores da fase móvel acarretam em um tempo de residência menor na coluna, visto isso, as moléculas dos enantiômeros têm menos tempo para interagir com a FEQ da coluna. Segundo Schmidt-Traub (2005), um valor de resolução de 1,5 corresponde a uma separação por linha de base na situação limite, onde as bandas se tocam. Sendo assim os valores obtidos são satisfatórios e representam uma boa separação.

No caso estudado prefere-se utilizar vazões maiores no limite de separação por linha de base, visto que a utilização de vazões menores implicaria em menor quantidade do enantiômero de interesse obtida por fração de tempo, apesar de maior a eficiência de separação que seria obtida. Como o objetivo principal do estudo é a ampliação de escala do fármaco estudado, o maior interesse é na quantidade obtida na separação e não somente na qualidade.

Tabela 4.1 - Parâmetros analíticos de separação do praziquantel na coluna Lux-2 a diferentes vazões.

Q (mL/min)	N _{p1}	N _{p2}	k ₁	k ₂	α	Rs
0,5	649	628	2,52	4,79	1,90	4,10
1	498	475	2,50	4,71	1,88	3,51
2	440	422	2,40	4,42	1,84	3,11

4.4 Análise dos perfis de sobrecarga

As Figuras 4.7, 4.8 e 4.9 mostram os perfis de eluição obtidos nas diferentes concentrações para a vazão da fase móvel de 1 mL/min e os volumes de injeção de 20, 60 e 100 μ L, respectivamente. Nessas figuras nota-se que com o aumento da concentração ocorre uma diminuição nos tempos de retenção e um pequeno alargamento dos picos.

Para os casos aqui apresentados, a diminuição dos tempos de retenção e o alargamento dos picos, que já não são tão acentuados quanto em condições diluídas, são um reflexo da não-linearidade do sistema sob as condições mostradas, que são relacionadas à saturação e/ou heterogeneidade da superfície ou às interações adsorbato-adsorbato na fase líquida e/ou próximo a superfície do adsorvente (James *et al.*, 1999).

A partir da observação das Figuras 4.7 a 4.9, pode-se ainda dizer que tanto a diminuição do tempo de retenção quanto o alargamento dos picos são mais evidentes na Figura 4.9, onde houve o maior volume de injeção (100 μ L).

Esses resultados mostram sobrecarga de concentração, que é caracterizada por perda de resolução, aumento na assimetria, que causa efeito de cauda nos cromatogramas, e redução dos tempos de retenção devido a um aumento da não-linearidade do equilíbrio de adsorção (Silva Jr. *et al.*, 2009).

Nestes casos, apesar da assimetria, a separação continua ocorrendo até a linha de base o que deve ser atribuído à elevada eficiência de separação da coluna quiral Lux celulose-2.

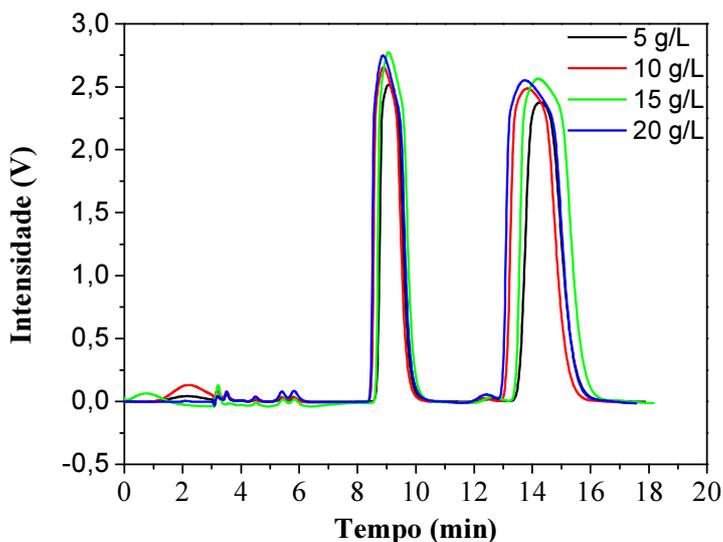


Figura 4.7 - Comparação dos perfis cromatográficos da solução de PZQ. Concentração: 5, 10, 15 e 20 g/L; vazão da fase móvel: 1 mL/min; volume de injeção: 20 μ L; fase móvel: etanol; temperatura: 25°C; comprimento de onda: 210 nm.

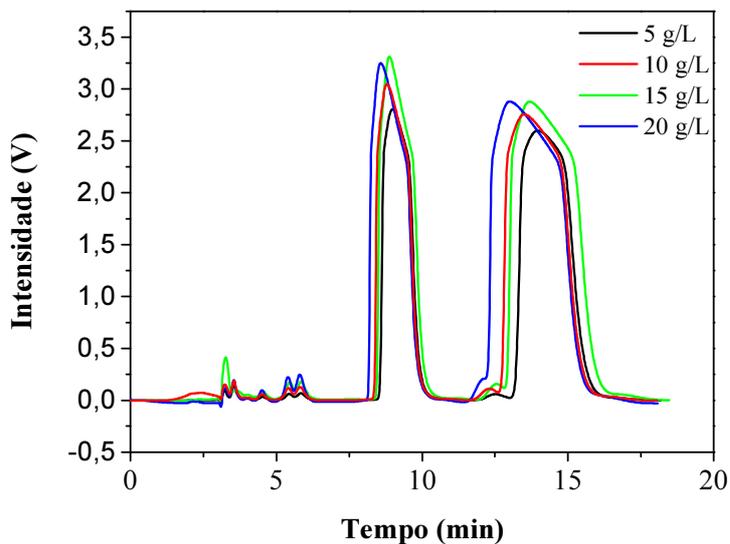


Figura 4.8 - Comparação dos perfis cromatográficos da solução de PZQ. Concentração: 5, 10, 15 e 20 g/L; vazão da fase móvel: 1 mL/min; volume de injeção: 60 μ L; fase móvel: etanol; temperatura: 25°C; comprimento de onda: 210 nm.

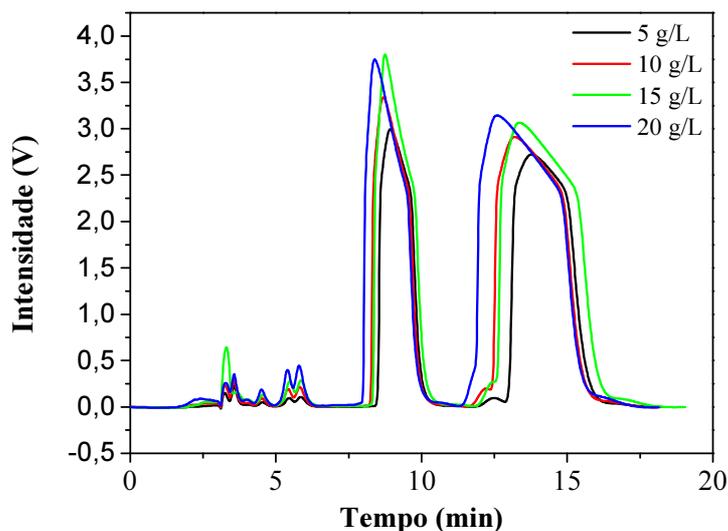


Figura 4.9 - Comparação dos perfis cromatográficos da solução de PZQ. Concentração: 5, 10, 15 e 20 g/L; vazão da fase móvel: 1 mL/min; volume de injeção: 100 μ L; fase móvel: etanol; temperatura: 25°C; comprimento de onda: 210 nm.

Na Figura 4.10 podemos observar os perfis obtidos no estudo de sobrecarga de volume. Os perfis foram separados para cada concentração (5, 10, 15 e 20 g/L) e cada vazão da fase móvel (0,5, 1 e 2 mL/min) e foram avaliados a influência do aumento do volume de injeção, que para este caso foram 20, 60 e 100 μ L.

Nota-se que para volumes crescentes de injeção todos os perfis mostram sobrecarga tanto de volume quanto de massa, revelando novamente decréscimo dos tempos de retenção, porém acompanhado de acentuada assimetria das frentes de massa de ambos os enantiômeros. Este efeito é frequentemente observado em sistemas de adsorção descritos por isoterma não lineares que apresentam comportamento assintótico quando a concentração de equilíbrio no fluido tende a infinito, como a isoterma de Langmuir, que terá seus parâmetros avaliados no decorrer deste trabalho (Farias *et al.*, 2012).

Fazendo uma comparação entre ambos os enantiômeros percebe-se um maior desvio da linearidade para o enantiômero mais retido, que apresenta maior alargamento das bases e maior redução dos tempos de retenção.

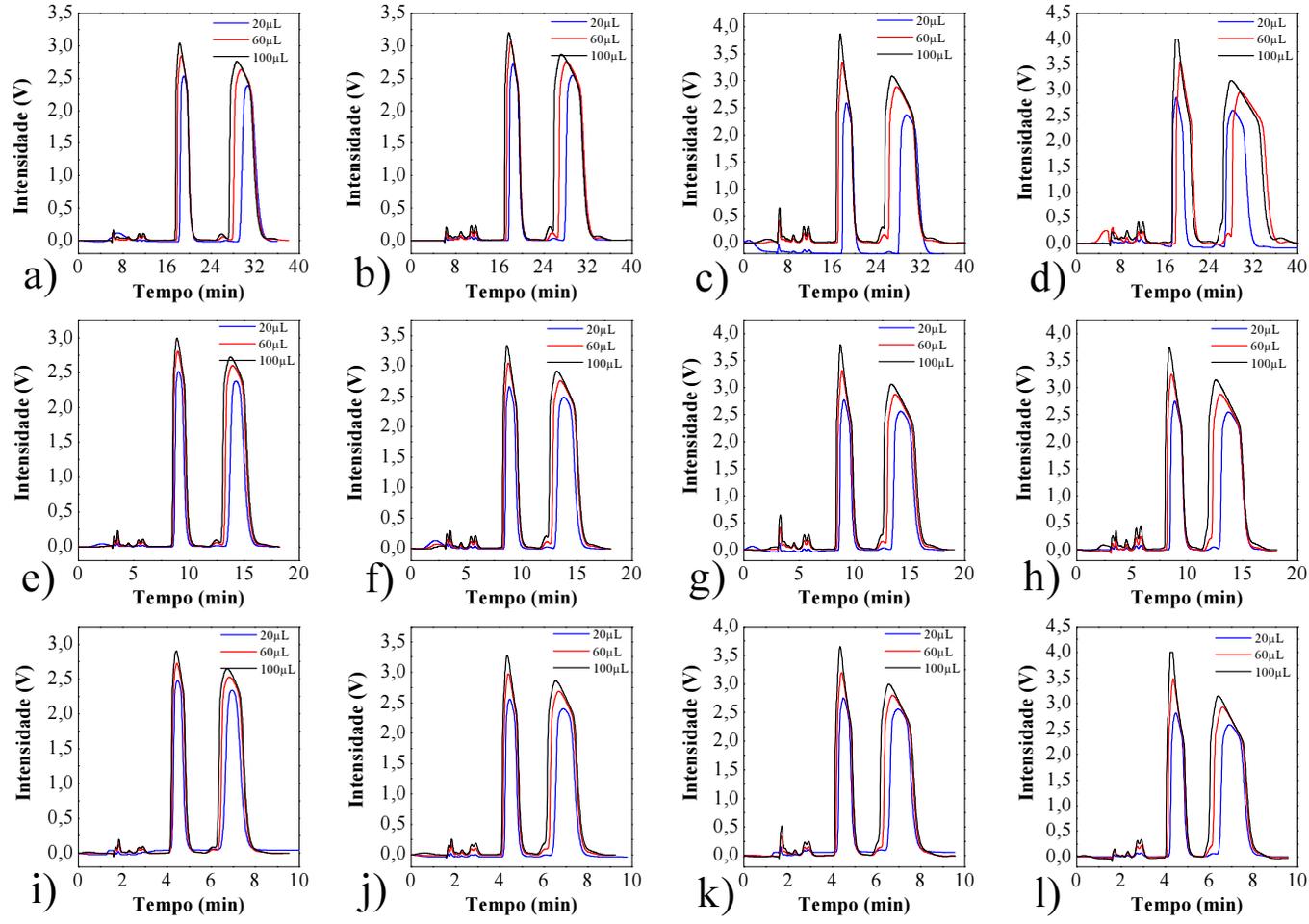


Figura 4.10 - Perfis cromatográficos com sobrecarga de volume. Nas concentrações de 5 g/L (a, e e i), 10 g/L (b, f e j), 15 g/L (c, g e k) e 20 g/L (d, h e l) e nas vazões de 0,5 mL/min (a, b, c e d), 1 mL/min (e, f, g e h) e 2 mL/min (i, j, k e l). Fase móvel: etanol; temperatura: 25°C; comprimento de onda: 210 nm.

Observa-se ainda que diferentemente do que foi visto nas Figuras 4.1, 4.2 e 4.3, aqui a influência do número de pratos no formato das bandas cromatográficas não é tão importante. O formato e a posição dos picos são determinados pela isoterma de adsorção, que além de descrever a diminuição dos tempos de retenção, descreve a subida inclinada na frente do pico e uma descida dispersa (Seidel-Morgenstern, 2004).

Resultado semelhante ao aqui observado foi feito por Rosa (2005) ao estudar o efeito do aumento do volume de injeção na separação dos enantiômeros do omeprazol utilizando FEQ Kromasil CHI-TBB.

Os resultados obtidos usando 20 g/L de amostra injetada (Figura 4.10 j, k e l) mostraram que mesmo nos maiores níveis de concentração e volume injetados a separação pretendida foi obtida por linha de base para todas as vazões praticadas.

4.5 Estimativa dos parâmetros da isoterma de Langmuir competitivo

A partir do procedimento descrito no item 3.2.3, utilizando um método que está entre o método dos tempos de retenção e o método inverso, após a minimização da função objetivo, foram obtidos os parâmetros da isoterma de Langmuir competitivo que estão mostrados na Tabela 4.2 e a isoterma está na Figura 4.11.

Tabela 4.2 - Parâmetros estimados da isoterma de Langmuir competitivo.

Parâmetros da isoterma de Langmuir Competitivo			
a₁	a₂	b₁	b₂
4,8924	6,7466	1,0000E-14	0,0389

É importante perceber que esta mistura dos dois métodos citados permitiu aproveitar as vantagens de cada um deles e desprezar as desvantagens. Uma desvantagem do MTR é não poder avaliar o sistema binário, aspecto que pôde ser superado utilizando a minimização. Além disso, o método inverso puro exigiria a calibração do detector e um grande volume de experimentos, aspecto este que foi superado pela utilização do MTR. Assim, pode-se dizer que as modificações de cada

método aqui utilizados permitiram a superação das dificuldades que seriam encontradas caso se tivesse utilizado cada um deles individualmente.

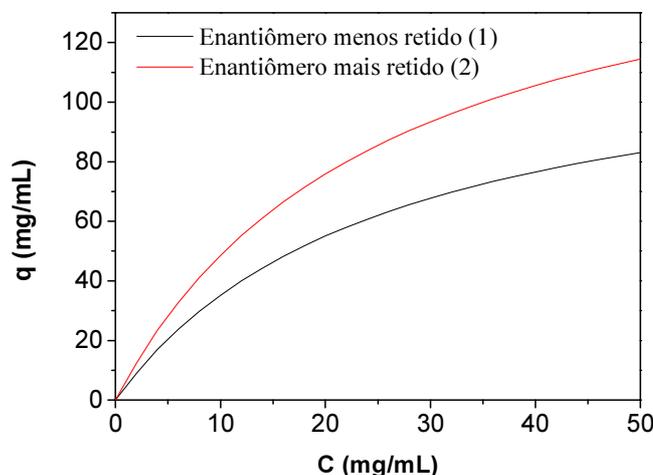


Figura 4.11 – Isotermas obtidas para os enantiômeros do praziquantel por um método híbrido entre o método dos tempos de retenção e o método inverso. Temperatura: 25°C. Solubilidade máxima do soluto no solvente ≈ 40 g/L.

4.5.1 Qualidade do ajuste obtido

Com intuito de testar a validade dos parâmetros estimados pelo método utilizado foram feitas as análises estatísticas a seguir.

Para o caso da estimação de mínimos quadrados, que foi a utilizada neste trabalho, como pode ser visto pela equação da função objetivo (Equação 3.16), sabe-se que a variância final dos desvios de predição é dada pela Equação 4.1 (Schwaab e Pinto, 2007).

$$\hat{\sigma}_y^2 = \frac{F.O.}{NE - NP} \quad (4.1)$$

Em que $\hat{\sigma}_y^2$ é a variância de predição do modelo, $F.O.$ é o valor alcançado para função objetivo, NE é o número de experimentos considerados e NP é o número de parâmetros estimados. $NE - NP$ é o número de graus de liberdade, v .

Para a fase de estimação de parâmetros foram considerados 36 experimentos ($NE = 36$) e 4 parâmetros foram estimados ($NP = 4$), o valor da função objetivo

alcançado foi 21,32 ($F.O.=20,23$). O que nos leva a uma variância de predição do modelo de 0,6322 pela Equação 4.1.

A variância de predição do modelo, $\hat{\sigma}_y^2$, pode ser comparada a variância dos erros experimentais, σ_y^2 , pelo teste F, caso as duas variâncias sejam semelhantes estatisticamente, o modelo pode ser considerado satisfatório (Schwaab e Pinto, 2007).

A variância dos erros experimentais foi calculada a partir dos tempos de retenção da frente de massa de ambos os componentes das réplicas experimentais feitas no ponto central (10 g/L, 60 μ L e 1 mL/min). O valor obtido foi de 0,0018.

O teste F consiste na comparação das variâncias, esta comparação pode ser dada pelo quociente entre as duas estimativas de variâncias (Equação 4.2) (Schwaab e Pinto, 2007).

$$F = \frac{\hat{\sigma}_y^2}{\sigma_y^2} \quad (4.2)$$

Para o caso estudado neste trabalho obteve-se um valor de F igual a 351,22. Os valores utilizados nestes cálculos estão mostrados na Tabela 4.3.

O próximo passo foi então a verificação do valor de F obtido, de modo a identificar se este valor está dentro do intervalo obtido para um nível de confiança de 98%. O cálculo deste intervalo foi feito no $\text{\textcircled{R}}\text{Excel}$ e para isso foram necessários os graus de liberdade associados à variância de predição do modelo e à variância experimental.

Tabela 4.3 - Valores utilizados no teste F.

	Experimental	Modelo
Variância (σ)	0,0018	0,6322
Graus de liberdade (ν)	2	32

Sabendo que o número de graus de liberdade é dado pela diferença do número de experimentos e do número de parâmetros, temos um grau de liberdade de 32 para a variância do modelo e de 2 para a variância experimental (já que foram utilizadas 4

réplicas ($NE=4$) e levados em consideração 2 parâmetros ($NP=2$). Obteve-se então que $0,1874 < F < 49,47$.

Percebe-se então que o valor de F obtido para o modelo utilizado é maior do que os valores do intervalo para que o modelo pudesse ser considerado confiável. Isso pode significar que o modelo não é capaz de explicar os erros experimentais, já que os erros de predição são significativamente maiores que os erros experimentais (Schwaab e Pinto, 2007).

Analisando o valor obtido da variância do erro experimental, mostrada na Tabela 4.3, pode-se perceber que provém de um erro experimental muito pequeno. Isso significa que o erro experimental pode ter sido subdimensionado. Para melhor avaliação do erro experimental seriam indicadas réplicas em outros experimentos.

Continuando a análise do método utilizado com intuito de saber se o modelo poderia ser considerado confiável, foi construído um gráfico, Figura 4.12, que relaciona a função dos mínimos quadrados para cada experimento levado em consideração.

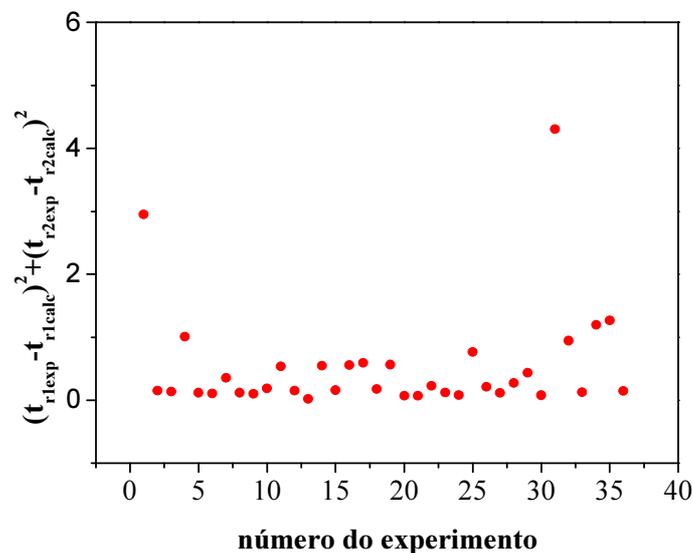


Figura 4.12 - Mínimos quadrados para cada experimento.

Pode-se observar no gráfico apresentado é que para a grande maioria dos experimentos a função de mínimos quadrados resultou em um valor bem pequeno, com uma média de 0,5. Observam-se dois pontos distantes da maioria, um por volta de 3 e

outro em 4,2 aproximadamente; esses valores podem ter apresentado este resultado devido ao que foi abordado anteriormente sobre o erro experimental subestimado.

Sendo assim, por este estudo, foi considerado que o método utilizado pode representar bem os valores experimentais obtidos e que, por isso, os valores estimados da isoterma de adsorção seriam utilizados na próxima etapa.

4.6 Avaliação dos resultados obtidos pelo Modelo do Equilíbrio Dispersivo

Nesta fase do trabalho foi seguido o procedimento descrito na seção 2.2.4. A Tabela 4.4 abaixo mostra os parâmetros de entrada inseridos no arquivo entradar.dat para os diversos experimentos simulados.

Tabela 4.4 - Dados de entrada utilizados na simulação.

Parâmetros da Isoterma de Langmuir Competitivo				
	a₁	a₂	b₁	b₂
	4,8924	6,7466	1,0000E-14	0,0389
Vazão da fase móvel (mL/min)				
	0,5	1	2	
Número de pratos				
N₁	649	498	440	
N₂	623	475	422	
Volume de injeção (µL)				
	20	60	100	
	140	180	250	
Concentração da solução de PZQ (g/L)				
	5	10	15	20
				40

Os dados de saída obtidos pelo programa são contidos no arquivo interm.dat. Como os cromatogramas experimentais estão em função da intensidade do sinal do detector (V) e os dados de saída fornecidos pelo programa computacional estão em

função de concentração (g/L), foi feito um estudo comparativo dos tempos de retenção da frente de massa.

Na Figura 4.13 estão mostrados os perfis cromatográficos simulados e experimentais, respectivamente, na concentração de 20 g/L, com vazão da fase móvel de 1 mL/min e com volumes de injeção de 20, 60 e 100 μ L.

Pode-se observar que as larguras das bases dos picos são bastante semelhantes, os perfis experimentais apresentam uma maior assimetria do que os perfis simulados, assim como o decréscimo no tempo de retenção também é maior nos perfis experimentais do que nos simulados, isto ocorre porque o método utilizado para estimação dos parâmetros considera somente os tempos de retenção de frente de massa, sendo assim a simulação se preocupa principalmente em reproduzir estes tempos. Fazendo uma comparação dos tempos de retenção das frentes de massa é possível observar que eles são bastante semelhantes. Para melhor avaliação foram elaborados gráficos comparando os tempos de retenção da frente de massa simulados e experimentais (Figuras 4.14, 4.15 e 4.16).

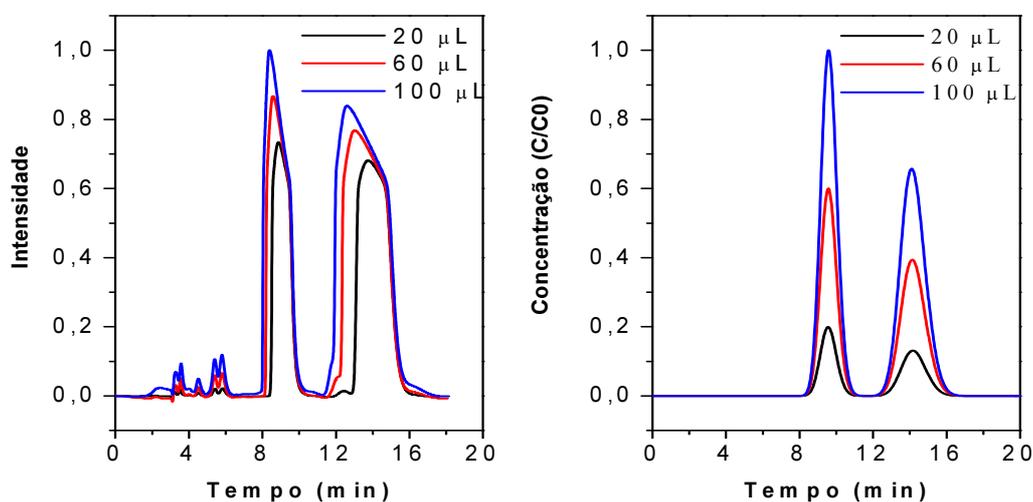


Figura 4.13 - Perfis cromatográficos experimental e simulado, respectivamente, na concentração de 20 g/L, vazão de 1 mL/min e volumes de injeção de 20, 60 e 100 μ L. Fase móvel: etanol; temperatura: 25°C.

Vale ressaltar que os perfis mostrados na Figura 4.13 são perfis onde houve grande quantidade de massa injetada na coluna e, mesmo assim, a simulação representou bem os dados experimentais.

Nas Figuras 4.14, 4.15 e 4.16 estão plotados os tempos de retenção das frentes de massa simulados e experimentais para os volumes de injeção utilizados, 20, 60 e 100 μL para ambos os componentes. O ajuste linear feito nas três figuras representa a situação de um modelo perfeito, onde os valores de tempo de retenção da frente de massa simulados seriam idênticos aos obtidos experimentalmente.

Para o caso de um volume de injeção de 20 μL pode-se dizer que os valores simulados representaram bem os experimentais, já que os pontos ficaram em cima e em torno da reta com apenas alguns pontos afastados para o componente mais retido, com valores de coeficiente de determinação, R^2 , para ambos os enantiômeros maior que 0,99.

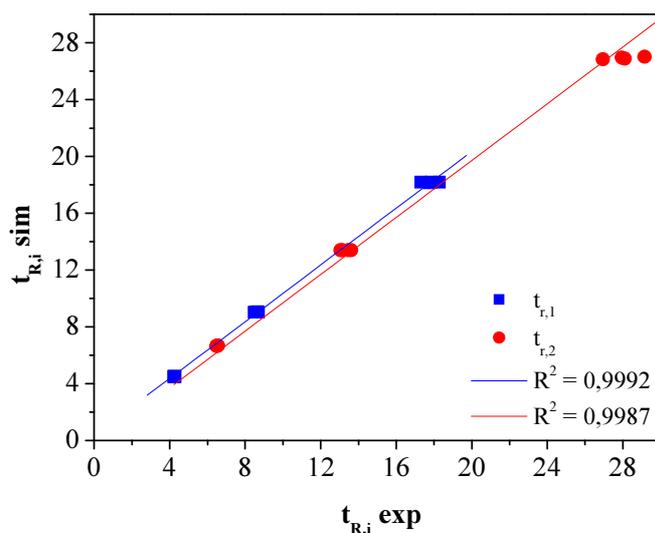


Figura 4.14 - Tempos de retenção da frente de massa simulados e experimentais para um volume de injeção de 20 μL .

Para um volume de injeção de 60 μL , nota-se que a qualidade dos dados simulados diminui para tempos de retenção maiores, correspondentes as menores vazões utilizadas, se comparado ao gráfico anterior, porém ainda assim pode-se dizer

que os valores simulados representam bem o conjunto de dados experimentais utilizados, novamente apresentando coeficientes de determinação maiores que 0,99.

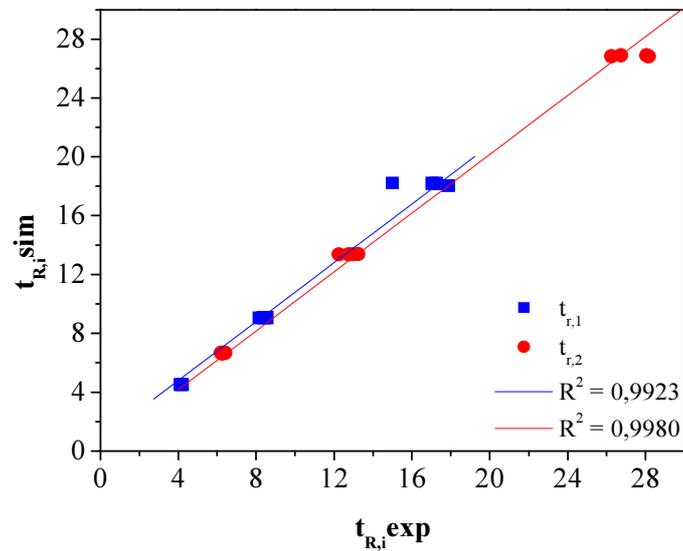


Figura 4.15 - Tempos de retenção da frente de massa simulados e experimentais para um volume de injeção de 60 μ L.

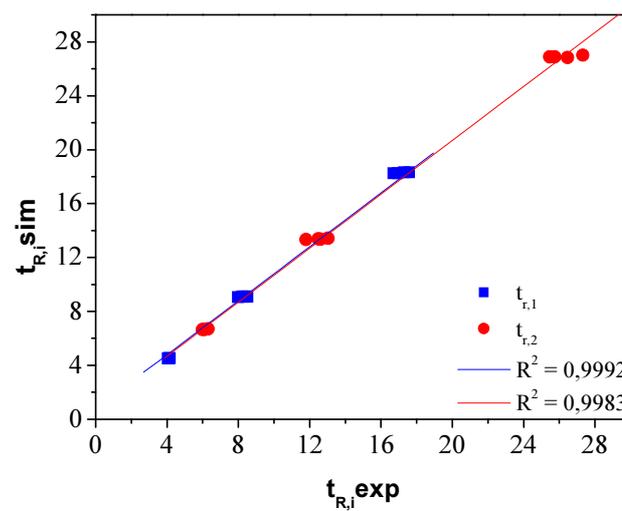


Figura 4.16 - Tempos de retenção da frente de massa simulados e experimentais para um volume de injeção de 100 μ L.

Com base nos resultados mostrados até agora se resolveu estudar a fonte dos erros percentuais obtidos entre os tempos de retenção da frente de massa experimentais e simulados, foram assim obtidas as Figuras 4.17, 4.18 e 4.19.

4.6.1 Avaliação dos erros percentuais entre os dados experimentais e simulados

Na Figura 4.17 foram plotados os erros (%) obtidos quando os tempos de retenção da frente de massa experimentais foram comparados com os simulados em função do volume injetado na coluna.

Pode-se perceber que os erros percentuais para o componente menos retido na coluna é maior do que para o componente mais retido. Sabe-se ainda que com o aumento do volume de injeção na coluna, maior o efeito de sobrecarga, resultando em um maior desvio da linearidade, onde a simulação apresenta maiores erros percentuais.

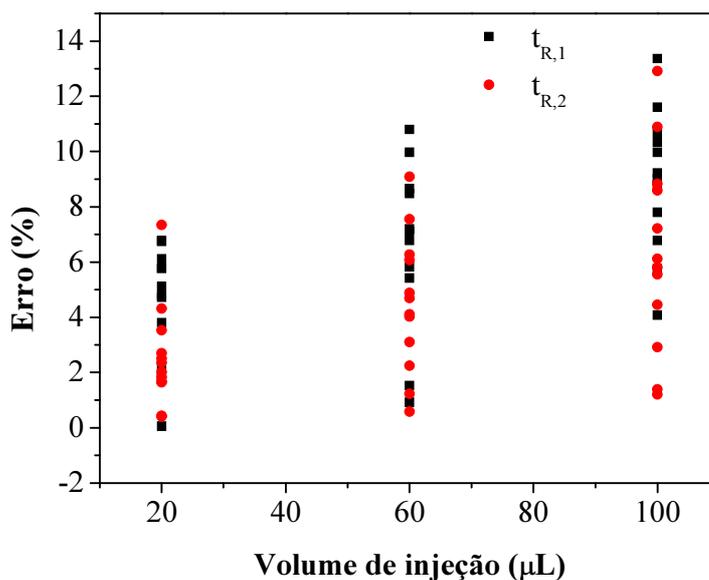


Figura 4.17 - Erro (%) *versus* volume de injeção (µL).

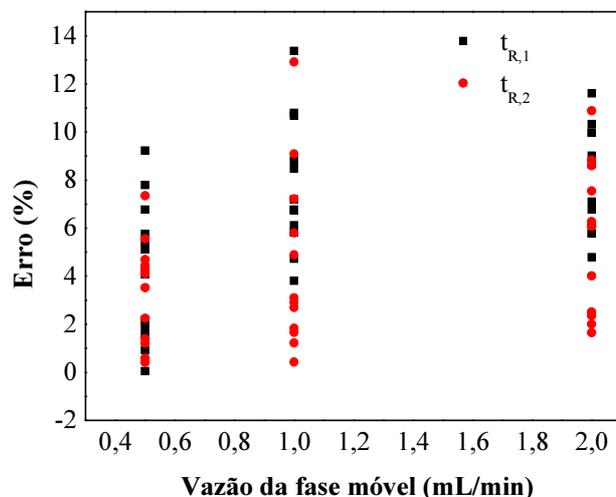


Figura 4.18 - Erro (%) versus vazão da fase móvel (mL/min).

A Figura 4.18 representa os erros percentuais obtidos na comparação dos tempos de retenção da frente de massa experimentais e simulados em função da fase móvel. Pode-se observar que tanto para o componente menos retido quanto para o mais retido os erros alcançam valores percentuais mais altos na vazão de 1 mL/min, mostrando assim que a vazão não influencia qualitativamente nos erros percentuais obtidos.

Por último foi analisado o comportamento do erro percentual em função da massa injetada, como mostrado na Figura 4.19.

Pode-se ver que, assim como observado nas duas figuras anteriores, os erros percentuais para o tempo de retenção da frente de massa do componente menos retido são maiores que para o componente mais retido. Observa-se também, de uma maneira geral, que quanto maior a quantidade de massa injetada maior o erro percentual, pois assim como para o volume de injeção se torna mais difícil de prever o comportamento pela simulação em condições de sobrecarga.

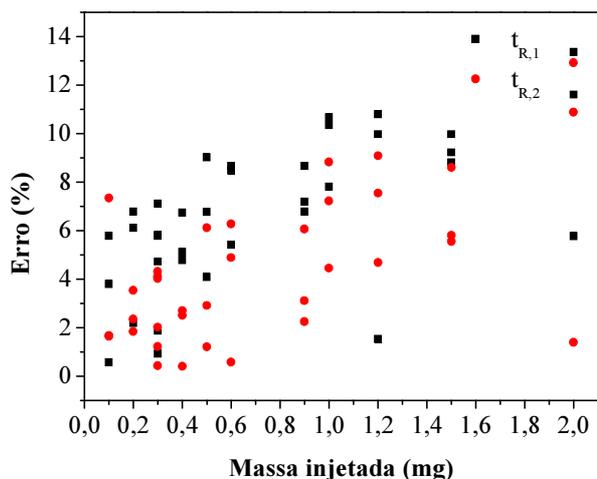


Figura 4.19 - Erro (%) versus massa injetada (mg).

4.7 Verificação da qualidade da predição do comportamento da coluna em condições de sobrecarga de volume

Foram testadas injeções de amostras com concentração de 40 g/L, solubilidade máxima do praziquantel em etanol, e volumes de 100, 140, 180, 250 μL (Figura 4.20), visando a investigação da condição que resulte no contato entre as frentes de massa de ambos os enantiômeros.

Os resultados mostrados na Figura 4.20 revelam que a condição-limite para a separação por linha de base está entre 180 e 250 μL de amostra injetada com concentração de 40 g/L e vazão de 1 mL/min.

Analisando os perfis cromatográficos pode-se perceber que para os dois volumes de injeção mais altos, 180 e 250 μL , a absorção ultrapassou a escala de monitoramento do detector UV do sistema de CLAE, porém pode-se dizer que houve diminuição nos tempos de retenção da frente de massa de ambos os enantiômeros e alargamento dos perfis.

A produção alcançada para um volume de injeção de 250 μL pôde ser calculada pela Equação 4.3 (Seidel-Morgenstern, 1998).

$$Produção = \frac{C_s V_{inj} / 2}{(t_{rjl} - t_{fri})} \quad (4.3)$$

em que C_S é a concentração da solução, 40 g/L, V_{inj} é o volume de injeção em mL, 0,250, t_{rj} é o tempo de retorno do componente mais retido, j, a linha de base, 21 neste caso, e t_{fri} é o tempo da frente de rompimento do componente menos retido, i, 7,5 neste caso.

O valor de produtividade obtido é de 533 mg/dia revelando uma produtividade compatível com operações semi-preparativas, apesar da coluna usada neste trabalho apresentar dimensões correspondentes a uma coluna analítica. Não foram encontrados na literatura estudos em condições semi-preparativas ou preparativas que utilizassem a coluna Lux-2.

Sabe-se ainda que a produtividade aumenta com o aumento das condições variadas aqui: volume de injeção, vazão da fase móvel e concentração da solução. Por isso a produtividade usada como referência foi àquela obtida na condição de maior sobrecarga testada.

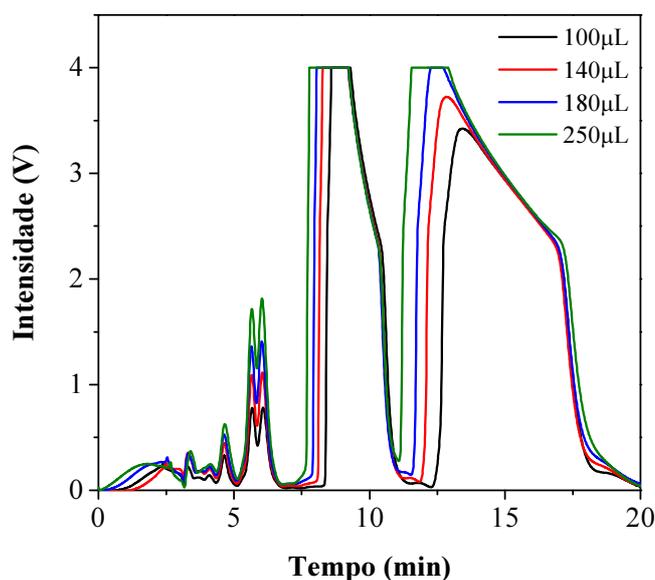


Figura 4.20 – Perfis cromatográficos de PZQ sobre condições de sobrecarga. Concentração: 40 g/L; vazão da fase móvel: 1 mL/min; volume de injeção: 100, 140, 180 e 250 µL; fase móvel: etanol; temperatura: 25°C; comprimento de onda: 210 nm.

Vale salientar que os resultados aqui demonstrados estão em concordância no que diz respeito ao comportamento dos picos cromatográficos sobre condições de sobrecarga com trabalhos encontrados na literatura, como o caso de Silva Jr. *et al.* (2009) que estudaram a separação dos anestésicos cetamina em MCTA e bupivacaína em Kromasil CHI-TBB por CLAE, bem como Seidel-Morgenstern e Guiochon (1993) que estudaram a separação de um racemato clássico, a base de Tröger, em MCTA.

Na estimação dos parâmetros da isoterma, como descrito em 3.2.3, não foram levados em consideração os experimentos de sobrecarga de volume na concentração de 40 g/L. Entretanto, com intuito de verificar se a simulação poderia prever o comportamento dos perfis cromatográficos em determinadas condições, foram adicionados como dados de entrada no programa computacional as condições que proporcionaram sobrecarga de volume e sobreposição das bandas em laboratório. Os erros percentuais estão mostrados na Tabela 4.5 e a comparação entre os perfis experimental e simulado estão mostrados na Figura 4.21.

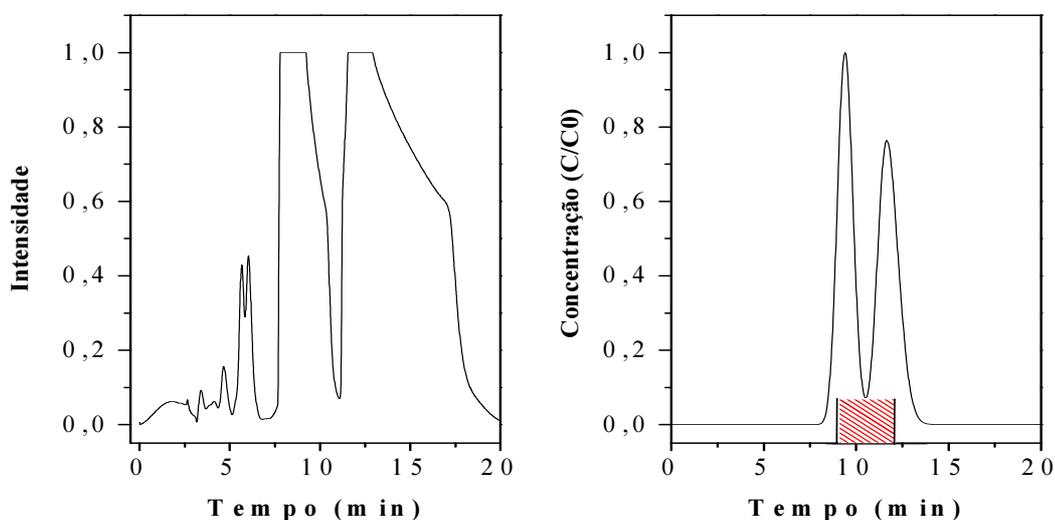


Figura 4.21 - Perfis cromatográficos experimental e simulado, respectivamente, nas condições de 40 g/L, 1mL/min e 250 μ L injetados. Fase móvel: etanol; temperatura: 25°C.

Ao analisar a Figura 4.21, pode-se observar que para o perfil simulado houve sobreposição das bandas como houve no perfil experimental, porém em um tempo

diferente. Enquanto há sobreposição das bandas no perfil experimental no tempo de 11,05 min, no perfil simulado ocorreu em 10,50 min. O que resulta em um erro percentual de 4,97%.

Deve-se lembrar de que os parâmetros estimados da isoterma utilizados na simulação foram baseados em uma função objetivo, então esses parâmetros fazem com que a distância média entre os tempos de retenção da frente de massa medidos e calculados seja mínima. Com isso, a partir da variância da função objetivo, obtida na seção 3.5.1 igual a 0,6322, pode-se obter um valor de desvio padrão e, finalmente, de erro de predição, como mostrado na Equação 4.4.

$$\text{Erro de predição} = 2,14 \times D.P. = 2,14 \times \sqrt{\hat{\sigma}_y^2} = 1,70 \quad (4.4)$$

Com o erro de predição pode-se chegar a uma faixa de valores que o tempo de retenção da frente de massa poderia ocupar (tempo \pm erro de predição). Dessa maneira a faixa de valores que o tempo onde houve sobreposição dos picos no perfil simulado poderia ocupar seria $8,80 < t < 12,2$, que é a faixa hachurada de vermelho na Figura 4.21.

Pelo perfil experimental identifica-se o tempo onde houve sobreposição das bandas como sendo 11,05, tempo este que está dentro do previsto pelos erros de predição.

Ao consultar a Tabela 4.5 percebe-se que o erro percentual aumenta com o volume injetado para o componente menos retido e diminui com o volume injetado para o componente mais retido, porém como foi visto no estudo feito para o volume de injeção mais alto, o erro predito ainda abrange esse erro percentual. Sendo assim, pode-se dizer que os parâmetros estimados para a isoterma de Langmuir representam o conjunto de dados aqui apresentados satisfatoriamente e que são capazes de predizer adequadamente os perfis a 40 g/L mesmo tendo sido estimados com os experimentos de 5 a 20 g/L.

Tabela 4.5 - Erros percentuais para as simulações sobre condições de sobrecarga de volume.

40 g/L		
	Erro (%) para $t_{R,1}$	Erro (%) para $t_{R,2}$
100 μL	5,17	13,30
140 μL	8,99	9,40
180 μL	11,30	5,93
250 μL	13,71	0,27

5. Conclusões

Foi estudada a separação cromatográfica dos enantiômeros do praziquantel utilizando uma fase estacionária quiral baseada no polissacarídeo celulose e modificada, celulose tris (3-cloro-4-metilfenilcarbamato), e comercialmente conhecida como Lux celulose-2, bem como a estimação de parâmetros da isoterma de Langmuir competitivo e utilização destes parâmetros para predição de comportamento da coluna cromatográfica.

Foram realizados experimentos variando as concentrações, vazões da fase fluida e volumes de injeção. Os experimentos com soluções diluídas mostraram eficiência de separação semelhante a outros trabalhos presentes na literatura. O número de pratos teóricos diminuiu com o aumento da vazão devido ao alargamento das bases dos picos e diminuição dos tempos de retenção, comportamento esperado em sistemas de cromatografia que apresentam alta eficiência de separação.

Tratando-se dos experimentos com soluções concentradas, foi observado um bom desempenho de separação em todas as condições testadas. A separação ocorreu por linha de base mesmo para altos volumes de injeção e pôde ser observada a diminuição do tempo de retenção com o aumento do volume de injeção, comportamento que indica uma isoterma de equilíbrio não linear.

Baseado no comportamento obtido nos experimentos de soluções concentradas, utilizou-se o modelo de Langmuir competitivo para avaliar os parâmetros da isoterma de equilíbrio. Assim, os dados experimentais foram utilizados em um método híbrido entre o método dos tempos de retenção e o método inverso, que aproveitou as vantagens que cada um dos métodos apresentam individualmente e descartou suas desvantagens, como a impossibilidade de prever o sistema binário (MTR) e a necessidade de calibração do detector (MI). A validade destes parâmetros foi testada estatisticamente pelo Teste F de Fisher e apesar do valor obtido para o teste não estar dentro do intervalo de confiança proposto, foi mostrado que os valores das funções objetivo são pequenos e que provavelmente o teste não foi validado por um subdimensionamento dos erros experimentais.

A simulação utilizando o modelo do equilíbrio dispersivo apresentou perfis cromatográficos mais simétricos do que os experimentais, entretanto mostrou tempos de retenção das frentes de massa compatíveis com os obtidos experimentalmente. Acredita-

se que isso seja causado pelo fato de que o método utilizado para estimar os parâmetros da isoterma se preocupa em prever os tempos de retenção das frentes de massa, e por isso pode resultar em falha na predição correta de todos os pontos do cromatograma. Neste caso, cabe uma maior avaliação no modelo no que diz respeito à predição da não linearidade observada nos dados experimentais.

Nos experimentos em condições de sobrecarga de volume foram testados volumes de injeção cada vez maiores de maneira a encontrar as condições em que ocorreria sobreposição das bandas. Com isso obteve-se uma produção de 533 mg/dia no limite de separação por linha de base, compatível com separações semi-preparativas.

Com isso, na simulação, foram testadas condições de sobrecarga de volume na concentração de 40 g/L, solubilidade máxima do praziquantel em etanol, para saber se o modelo do equilíbrio dispersivo descreveria bem essas situações, mesmo utilizando parâmetros de isoterma estimados com os dados experimentais de 5 a 20 g/L. Com isso obteve-se que o erro percentual aumenta com o aumento do volume de injeção para o enantiômero menos retido e diminui com o aumento do volume de injeção para o enantiômero mais retido. Entretanto, consideraram-se os resultados satisfatórios visto que para o volume de injeção mais alto os erros de predição, calculados a partir da variância, abrangem uma faixa onde estão inseridos os dados obtidos experimentalmente.

Assim, pode-se concluir que o método utilizado é de grande utilidade, permitindo uma estimativa rápida dos parâmetros da isoterma de Langmuir competitivo e que o modelo do equilíbrio dispersivo descreveu bem o conjunto de experimentos propostos de maneira eficaz, por ser um modelo simples, servindo como ferramenta de predição do comportamento da coluna utilizada. Apesar de falhas no que diz respeito à representação da não linearidade do sistema, o método desenvolvido se mostrou eficiente na predição da sobreposição das bandas, além de rápido se comparado com outros métodos normalmente utilizados para o mesmo fim.

5.1 Sugestões para trabalhos futuros

- Realização de réplicas dos experimentos em outros pontos de modo a realizar uma reavaliação dos erros experimentais.

- Aprofundamento do estudo do método utilizado de modo a produzir resultados de simulação que possam reproduzir não somente os pontos de sobreposição das bandas, como também a não linearidade do sistema estudado.
- Ajuste de parâmetros utilizando outras isothermas não lineares, visando uma visão mais aprofundada no que diz respeito à qualidade dos parâmetros da isoterma.
- Visando dar continuidade a este trabalho, indica-se a utilização de coluna preparativa para a separação proposta e, posteriormente, a utilização de métodos contínuos para a separação proposta.

Referências

ALLINGER, N. L.; CAVA, M. P.; DE JONGH, C. R.; LEBEL, N. A.; STEVENS, C. L. Química Orgânica, Editora Guanabara, Rio de Janeiro, 2ª edição, 1978.

ANTELO, F.S. Separação Cromatográfica dos enantiômeros de O,P'-Diclorodifenildicloroetano sob condições líquidas e supercríticas. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2011.

ARAÚJO, J.M.M.; RODRIGUES, R.C.R.; EUSÉBIO, M.F.J.; MOTA, J.P.B. Chiral separation by two-column, semi-continuous, open-loop simulated moving bed chromatography. **Journal of Chromatography A**, 1217 (33), 5407-5419, 2010.

BARRETO JR., A. G. Projeto de Sistemas Cromatograficos para a Separacao de Lapachol. Tese de doutorado, COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil. 2005.

BARRETO JR., A.; SILVA JR., I. J.; SANTOS, M.; VEREDAS, V; SANTANA, C.. Modeling, simulation and experimental evaluation of continuous chromatographic separation of ketamine enantiomers on MCTA. **Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies**, 31 (20), 3057-3076, 2008.

BENTLEY, J.; SLOAN, C; KAWAJIRI, Y. Simultaneous modeling and optimization of nonlinear simulated moving bed chromatography by the prediction-correction method. **Journal of Chromatography A**, 1280, 51-63, 2013.

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

CAVAZZINI, A.; BARDIN, G.; KACZMARSKI, K.; SZABELSKI, P.; AL-BOKARI, M.; GUIOCHON, G. Adsorption equilibria of butyl- and amylbenzene on monolithic silica-based columns. **Journal of Chromatography A**, 957(2), 111-126, 2002.

CERUTTI, E. L., 2003, Separacao de Compostos Petroquimicos em Unidades de Leito Móvel Simulado. Dissertação de mestrado, UFSC, Florianópolis, SC, Brasil.

Referências

CHEN, X.; ZOU, H.; NI, J.; FENG, S. Synthesis and characteristics of composite chiral stationary phases based on cellulose derivatives. **Journal of Separation Science**, 26, 29-36, 2003.

CHING, C., LIM, B., LEE, E., Preparative resolution of praziquantel enantiomers by simulated counter-current chromatography, **Journal of Chromatography**, 634, 215-219, 1993.

CHING, C.B.; LIM, B.G.; LEE, E.J.D.; NG, S.C. Preparative resolution of praziquantel enantiomers by simulated counter-current chromatography. **Journal of Chromatography**, 634, 215-219, 1993.

CHING, C.B.; RUTHVEN, D.M.; HIDAJAT, K. Experimental study of a simulated counter-current adsorption system—_III. Sorbex operation. **Chemical Engineering Science**, 40 (8), 1411-1417, 1985.

EMERICK, G.L.; OLIVEIRA, R.V.; BELAZ, K.R.A.; GONÇALVES, M.; DEOLIVEIRA, G.H. Semipreparative enantioseparation of methamidophos by HPLC-UV and preliminary in vitro study of Butyrylcholinesterase inhibition. **Environmental Toxicology and Chemistry**, 31, 239-245, 2012.

Farmacopéia Brasileira, 4. ed. São Paulo: Atheneu Ed. São Paulo, 1996. Monografia Praziquantel matéria prima 61.

FELLINGER, A.; CAVAZZINI, A.; GUIOCHON, G. Numerical Determination of the competitive isotherm of enantiomers. **Journal of Chromatography A**, 986, 207-225, 2003.

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

FRANCOTTE, E. R. Contribution of Preparative Chromatographic Resolution to the Investigation of Chiral Phenomena. **Journal of Chromatography**, 666, 565-601, 1994.

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

FRANCOTTE, E.R.; RICHERT, P. Applications of simulated moving-bed chromatography to the separation of the enantiomers of chiral drugs. **Journal of Chromatography A**, 769, 101–107, 1997.

GOLSHAN-SHIRAZI, S.; GUIOCHON, G. Experimental Characterization of the Elution Profiles of High Concentration Chromatographic Bands Using the Analytical Solution of the Ideal Model. **Analytical Chemistry**, 61, 462-467, 1989.

GRILL, C.; MILLER, L. Separation of a racemic pharmaceutical intermediate using closed-loop steady state recycling. **Journal of Chromatography A**, 827, 359–371, 1998.

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

GUICHON, G.; FELLINGER, A.; SHIRAZI, D.G.; KATTI, A.M. *Fundamentals of Preparative and Nonlinear Chromatography*. Elsevier: San Diego, 2006.

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

HAAG, J.; WOUWER, A.V.; LEHOUCQ, S.; SAUCEZ, P. Modeling and simulation of a SMB chromatographic process designed for enantioseparation. **Control Engineering Practice**, 9 (8), 921-928, 2001.

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

HOFFMEISTER, C.; BANDINI, T.; BARRETO JR. A.; ROCHA, H., Separação cromatográfica dos enantiômeros do praziquantel. Relatório Interno, Escola de Química, UFRJ, 2010.

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

- JAVEED, S.; QAMAR, S.; ASHRAF, W.; WARNECKE, G.; SEIDEL-MORGENSTERN, A. Analysis and numerical investigation of two dynamic models for liquid chromatography. **Chemical Engineering Science**, 90, 17-31, 2013.
- KELLY, J.W.; HE, L.; STEWART, J. Liquid chromatographic separation of praziquantel enantiomers in serum using a cellulose-based chiral stationary phase. **Journal of Pharmaceutical & Biomedical Analysis**, 11, 1141-1144, 1993.
- KIM, J., LEE Y., PARK, H. RIM, C. Formation of Pyrazinoisoquinoline Ring System by the Tandem Amidoalkylation and N-Acyliminium Ion Cyclization: An Efficient Synthesis of Praziquantel, **Tetrahedron** **54**, 7395-7400, 1998.
- KUMAR, V; GRYSEELS, B. Use of praziquantel against schistosomiasis: a review of current status, **International Journal of Antimicrobial Agents**, 4, 313-320, 1994.
- LEE, B.G, CHING, C.B. Characterization of Chiral Adsorbents on the Chromatographic Separation of Praziquantel Enantiomers, **Industrial & Engineering Chemistry Research**, 35, 169-175, 1996.
- LIM, B.G.; CHING, C.B. Preliminary design of a simulated counter-current chromatographic system for the separation of praziquantel enantiomers. **Journal of Chromatography A**, 734, 247-258, 1996.
- LIM, B.G.; CHING, C.B., Characterization of Chiral Adsorbents on the Chromatographic Separation of Praziquantel Enantiomers, **Industrial & Engineering Chemistry Research**, 35, 169-175, 1996b.
- LIMA, V. L. E. Os fármacos e a quiralidade: uma breve abordagem. **Química Nova**, 20(6), 657-663, 1997.
- LIU, J.; STEWART, J.T. High-performance liquid chromatography determination of praziquantel enantiomers in human serum using a reversed-phase cellulose-based chiral stationary phase and disc solid-phase extraction, **Journal of Chromatography B**, 692, 141-147, 1997.
- LUDEMANN-HOMBOURGER, O.; PIGORINI, G.; NICOUD, R.-M.; ROSS, D.S.; TERFLOTH, G. Application of the "Varicol" process to the separation of the isomers of the SB-553261 racemate. **Journal of Chromatography A**, 947, 59-68, 2002.

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

MEYER, T.; SEKLJIC, H.; FUCHS, S.; BOTHE, H., DCHOLLMEYER, D.; MICULKA, C. Taste, A New Incentive to Switch to (R)-Praziquantel in Schistosomiasis Treatment. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, 3, 2009.

MORRISON, R.; BOYD, R.; Química orgânica. Fundação Calouste Gulbenkian, 12^a edição, 1983.

NEGAWA, M., SHOJI, F. Optical resolution by simulated moving-bed adsorption technology. **Journal of Chromatography**, 590, 113–117, 1992.

NOWAK, J.; ANTOS, D.; SEIDEL-MORGENSTERN, A. Theoretical study of using simulated moving bed chromatography to separate intermediately eluting target compounds. **Journal of Chromatography A**, 1253, 58-70, 2012.

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

ORLANDO, R.M.; CARDOSO FILHO, N.; GIL, E.S.; STRINGHETTA, J.P.S. Importância farmacêutica dos fármacos quirais. **Revista Eletrônica de Farmácia**, 4 (1), 08-14, 2007.

PAISA, L.S.; RODRIGUES, A.E. Design of simulated moving bed and Varicol processes for preparative separations with a low number of columns. **Journal of Chromatography A**, 1006, 33–44, 2003.

PEPER, S.; JOHANNSEN, M.; BRUNNER, G. Preparative chromatography with supercritical fluids Comparison of simulated moving bed and batch processes. **Journal of Chromatography A**, 1176, 246–253, 2007.

REKOSKE, J., Chiral Separation, **AIChE Journal**, 47, 1, 2001.

RENAME, Relação Nacional de Medicamentos Essenciais/Ministério da Saúde. Brasília, 2008.

- ROSA, P.C.P. Estudo da separação cromatográfica dos enantiômeros do omeprazol em fase estacionária quiral Kromasil CHI-TBB (0,0'-BIS[4-*TERC*-BUTILBENZOIL]-N,N'DIALIL-L-TARTADIAMIDA). Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2005.
- ROSZKOWSKI, P., MAURINB, J., CZARNOCKI, Z. Enantioselective synthesis of (R)-(-)-praziquantel (PZQ), **Tetrahedron: Asymmetry**, 17, 1415–1419, 2006.
- RUTHVEN, D. M., Principles of Adsorption and Adsorption Processes. John Wiley & Sons: New York, 1984.
- SANTANA, C ; SILVA JR., I.; AZEVEDO, D.; BARRETO JR.; A. G. Adsorption in Simulated Moving Beds. In: Michael C. Flickinger (Editor). (Org.). Encyclopedia of Industrial Biotechnology, Bioprocess, Bioseparation and Cell Technology. Amsterdam: Wiley, 2010
- SCHLINGE, D.; SCHERPIAN, P.; SCHEMBECKER, G. Comparison of process concepts for preparative chromatography. **Chemical Engineering Science**, 65, 5373-5381, 2010.
- SCHMIDT-TRAUB, H., Preparative Chromatography of Fine Chemicals and Pharmaceutical Agents, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co, 2005.
- SCHWAAB, M.; PINTO, J.C. Análise de Dados Experimentais I – Fundamentos de Estatística e Estimação de Parâmetros. E-papers: Rio de Janeiro, 2007.
- SEIDEL- MORGENSTERN, A.; GUIOCHON, G. Thermodynamics of the adsorption of Tröger's base enantiomers from ethanol on cellulose triacetate. **Journal of Chromatography**, 631, 37-47, 1993.
- SEIDEL-MORGENSTERN, A. Optimization and Comparison of Different Modes of Preparative Chromatography. **Analisis Magazine**, 26, 46-55, 1998.
- SEIDEL-MORGENSTERN, A. Experimental determination of single solute and competitive adsorption isotherms. **Journal of chromatography A**, 1037, 255-272, 2004.
- SEWELL, P.; CLARKE, B. Chromatographic Separations. (Analytical chemistry by opening learning (ACOL) series). Chichester, Wiley, 1987.

Referências

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

SILVA JR., I.J.; VEREDAS, V.; SANTOS, M.A.G.; SANTANA, C.C.; CARPES, M.J.S.; CORREIA, C.R.D. Cromatografia em leito móvel simulado na produção de substâncias enantiomericamente puras ou enriquecidas em larga escala. **Química Nova**, 29(5), 1027-1037, 2006.

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

SINGH, A.K.; KEDOR-HACKMANN, E.R.M; SANTORO, M.I.R.M.S. Cromatografia líquida com fase quiral aplicada na separação enantiomérica de fármacos cardiovasculares, **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, 42, 553–566, 2006.

SOLOMONS, G.; FRYHLE, C. Organic chemistry. 7 ed. New York: Ed. John Wiley & Sons, p.184-210, 2000.

SUBRAMANI, H.J.; HIDAJAT, K., RAY, A.K. Optimization of reactive SMB and Varicol systems. **Computers and chemical engineering**, 27, 1883-1901, 2003.

WANG, X; FAN, D.; LUO, Y. Breakthrough Model of Recombinant Human-Like Collagen in Immobilized Metal Affinity Chromatography. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 158, 262-276, 2009.

WONGSO, F., HIDAJAT, K., RAY, A.K. Application of multi-objective optimization in the design of simulated moving bed for chiral drug separation. **Biotechnology & Bioengineering**, 87 (6), 704–722, 2004.

WONGSO, F., HIDAJAT, K., RAY, A.K. Improved performance of moving bed technology for continuous separation of 1, 1_-bi-2-naphtol racemate. **Separation and Purification Technology**, 46, 168–191, 2005.

XU, J.; ZHU, L.; XU, G.; YU, W.; RAY, A.K. Determination of competitive adsorption isotherm of enantiomers on preparative chromatographic columns using inverse method. **Journal of Chromatography A**, 1273, 49-56, 2013.

ZENONI, G., PEDEFERRI, M.P., MAZZOTTI, M., MORBIDELLI, M. On-line monitoring of enantiomer concentration in chiral simulated moving bed chromatography. **Journal of Chromatography A**, 888, 73–83, 2000.

ZHANG, T.; NGUYEN, D.; FRANCO, P. Reversed-phase screening strategies for liquid chromatography on polysaccharide-derived chiral stationary phases. **Journal of Chromatography A**, 1217, 1048-1055, 2010.

ZHANG, Z., HIDAJAT, K., RAY, A.K. Multiobjective optimization of SMB and Varicol process for chiral separation. **A.I.Ch.E. Journal**, 48, 2800–2816, 2000.

ZHANG, Z.; MAZZOTTI, M.; MORBIDELLI, M. PowerFeed operation of simulated moving bed units: changing flow-rates during the switching interval. **Journal of Chromatography A**, 1006, 87-99, 2003.

ZHANG, Y.; HIDAJATA, K.; RAY, A.K. Enantio-separation of racemic pindolol on 1-acid glycoprotein chiral stationary phase by SMB and Varicol. **Chemical Engineering Science**, 62, 1364 –1375, 2007.

Apêndice

O sistema de Equações 1 e 2 mostrados abaixo é o clássico sistema de equações parciais diferenciais de primeira ordem do modelo ideal da cromatografia.

$$\frac{\partial C_1}{\partial t} + F \frac{\partial q_1}{\partial t} + u \frac{\partial C_1}{\partial z} = 0 \quad (1)$$

$$\frac{\partial C_2}{\partial t} + F \frac{\partial q_2}{\partial t} + u \frac{\partial C_2}{\partial z} = 0 \quad (2)$$

Sabendo que a alimentação injetada é uma mistura binária, ter-se-á uma região na coluna em que os dois componentes estão simultaneamente presentes. Essa região se propaga na coluna enquanto progressivamente se tornam duas bandas dos componentes puros. Na zona de mistura, as concentrações C_1 e C_2 , que coexistem em certo tempo e em certo ponto, não estão associadas aleatoriamente. Suas velocidades devem ser iguais, sendo assim, elas vão se propagar juntamente enquanto elas existirem. Entretanto, as moléculas do soluto em uma fatia que têm concentrações C_1 e C_2 não se propagam na velocidade das concentrações C_1 e C_2 , mas mais lentamente. No processo, as fatias correspondentes se tornam mais largas e mais diluídas, isso permite a separação. Como a diluição continua incessantemente na cromatografia, existirá um tempo em que as concentrações C_1 e C_2 desaparecerão.

As velocidades associadas a uma dada concentração são dadas pelas Equações 3 e 4.

$$u_{z,1} = \frac{u}{1 + F \frac{Dq_1}{DC_1}} \quad (3)$$

$$u_{z,2} = \frac{u}{1 + F \frac{Dq_2}{DC_2}} \quad (4)$$

em que as diferenciais Dq_i/DC_i são as derivadas direcionais, cujas Equações 5 e 6 as descrevem.

$$\frac{Dq_1}{DC_1} = \frac{\partial q_1}{\partial C_1} + \frac{dC_2}{dC_1} \frac{\partial q_1}{\partial C_2} \quad (5)$$

$$\frac{Dq_2}{DC_2} = \frac{\partial q_2}{\partial C_2} + \frac{dC_1}{dC_2} \frac{\partial q_2}{\partial C_1} \quad (6)$$

As velocidades $u_{z,1}$ e $u_{z,2}$ são funções das concentrações C_1 e C_2 . A propriedade mais importante das Equações 1 e 2 é a igualdade das duas derivadas direcionais (Equações 5 e 6), tendo como consequência que as velocidades características $u_{z,1}$ e $u_{z,2}$ associadas as concentrações C_1 e C_2 são iguais (Equação 7).

$$u_{z,1} = u_{z,2} \quad (7)$$

Essa igualdade define uma relação entre as concentrações C_1 e C_2 que define quais são os pares de concentrações que podem coexistir durante a separação.

Substituindo as Equações 3 e 4 na Equação 7 e utilizando a igualdade das duas derivadas direcionais (Equações 5 e 6), temos a Equação 8:

$$\frac{\partial q_2}{\partial C_1} \left[\frac{dC_1}{dC_2} \right]^2 + \left(\frac{\partial q_2}{\partial C_2} - \frac{\partial q_1}{\partial C_1} \right) \frac{dC_1}{dC_2} - \frac{\partial q_1}{\partial C_2} = 0 \quad (8)$$

No caso de isotermas de Langmuir competitivas, no qual este caso se enquadra a Equação 8 se torna a Equação 9 mostrada abaixo.

$$\alpha' b_1 C_2^0 r^2 - (\alpha' - 1 + \alpha' b_1 C_1^0 - b_2 C_2^0) r - b_2 C_1^0 = 0 \quad (9)$$

em que $r = dC_1/dC_2$.

Anexos

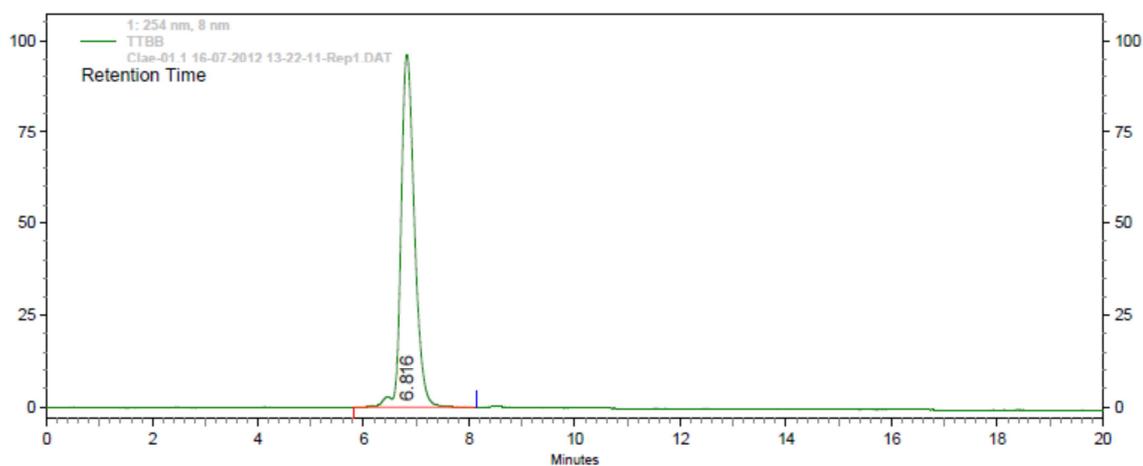


Figura A – Cromatograma do TTBB. Condições experimentais: fase móvel: etanol; concentração total de alimentação: 1 g/L; vazão da fase móvel: 0,5 mL/min; temperatura: 25°C; volume de injeção: 20 μ L.

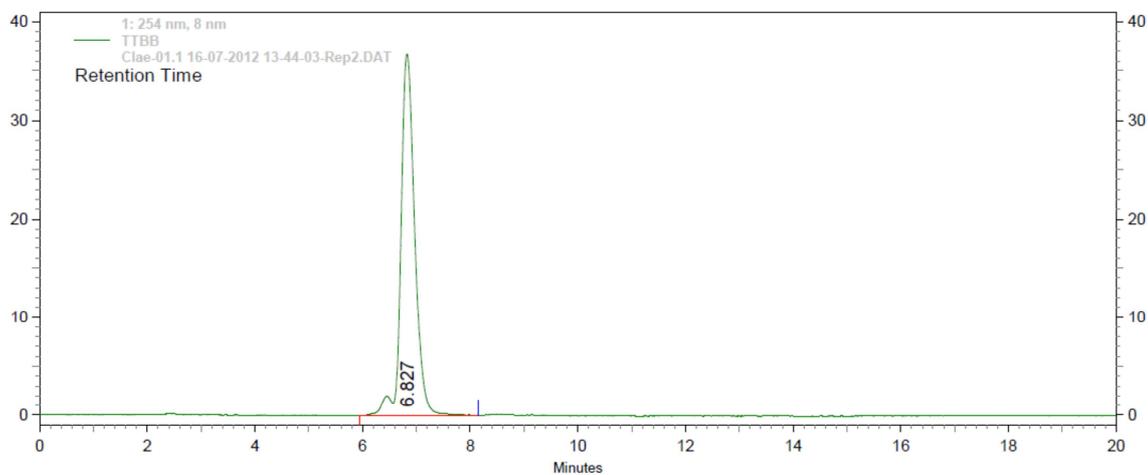


Figura B – Cromatograma do TTBB. Condições experimentais: fase móvel: etanol; concentração total de alimentação: 1 g/L; vazão da fase móvel: 0,5 mL/min; temperatura: 25°C; volume de injeção: 10 μ L.