



# PROCESSOS DE SEPARAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE PRODUTOS FARMACÊUTICOS



Organizadores  
Cesar Costapinto Santana  
Álvaro Silva Lima

# Processos de Purificação de Bioativos para a Indústria Farmacêutica



Aracaju - Sergipe  
2022

## GRUPO TIRADENTES

### **Conselho de Administração**

Jouberto Uchôa de Mendonça  
Amélia Maria Cerqueira Uchôa  
Marília Cerqueira Uchôa Santa Rosa  
Jouberto Uchôa de Mendonça Júnior  
Dionísio Cerqueira Uchôa

### **Superintendente Geral**

Luciano Kliemaschewsk

### **Vice-Presidente Acadêmico**

Temisson José dos Santos

### **Vice-Presidente de Relações Institucionais**

Saumineo da Silva Nascimento

### **Diretora da Editora Universitária Tiradentes - Edunit**

Cristiane de Magalhães Porto



## UNIVERSIDADE TIRADENTES

### **Reitor**

Jouberto Uchôa de Mendonça

### **Vice - Reitora**

Jouberto Uchôa de Mendonça Júnior

### **Pró-Reitora de Graduação Presencial**

Arleide Barreto

### **Pró-Reitor de Pós-Graduação, Pesquisa e Extensão**

Diego Menezes



## EDITORA UNIVERSITÁRIA TIRADENTES

### **Diretora**

Cristiane Porto

### **Produção Gráfica**

Igor Bento

### **Administrativo**

Thalita Costa

### **Conselho Editorial**

Ronaldo Nunes Linhares  
Gabriela Maia Rebouças  
Ricardo Luiz C. de Albuquerque Júnior  
Álvaro Silva Lima



EDITORA UNIVERSITÁRIA  
**TIRADENTES**

## Produção Editorial

Alexandre Chagas  
Cristiane Porto  
**Normalização**

Ana Regina Messias  
**Revisão**

Igor Bento e Alexandre Vieira  
**Capa e diagramação**

Biancoblue  
**Foto capa**

Editora Filiada à



Direitos autorais 2023

Direitos para essa edição cedidos à EDUNIT.

Feito o Depósito Legal.

Grafia atualizada conforme o Acordo Ortográfico da Língua Portuguesa de 1990, em vigor no Brasil desde 2009.

É proibida a reprodução total ou parcial, de qualquer forma ou por qualquer meio. A violação dos direitos de autor (lei nº 9.610/98) é crime estabelecido pelo artigo 184 do Código Penal.

EDITORA  
UNIVERSITÁRIA  
TIRADENTES



Av. Murilo Dantas, 300 Farolândia

Bloco F - Sala 11 - 1º andar

Aracaju - Sergipe

CEP 49032-490

<http://www.editoratiradentes.com.br>

E-mail: [editora@unit.br](mailto:editora@unit.br)

Fone: (79) 3218-2138/2185

p963

Processos de Purificação de Bioativos para a Indústria Farmacêutica / organização [de] César Costapinto Santana, Álvaro Silva Lima – Aracaju-SE: EDUNIT, 2023.

200 p.; il. pdf

Inclui bibliografia.

ISBN- 978-65-88303-19-1

DOI- 10.17564/2023.88303.19.1

1. Processos. 2. Bioativos. 3. Indústria Farmacêutica. 4. biofármacos I. Santana, César Costapinto II. Lima, Álvaro Silva IV. Universidade Tiradentes. V. Título.

CDU: 601.2:577.11

# **SUMÁRIO**

**10**

## **Prefácio**

**13**

### **Separação cromatográfica de produtos farmacêuticos: motivação e fundamentos**

Cesar Costapinto Santana, Tamires dos Reis Menezes,  
Juliana Faccin de Conto Borges, Silvia Maria Egues Dariva

**58**

### **Separação cromatográfica preparativa em sistemas cromatográficos contínuos de leito móvel simulado**

Cesar Costapinto Santana, Ivanildo José Silva Jr., Amaro Gomes Barreto Jr.

**92**

### **Separação cromatográfica preparativa em sistema contínuo Varicol: estudos de casos com moléculas quirais**

Cesar Costapinto Santana, Ivanildo José Silva Jr., Amaro Gomes Barreto Jr.

**136**

### **Separação dos enantiômeros do praziquantel utilizando leito móvel simulado em escala semi-preparativa**

Felipe Coelho Cunha, Amaro Gomes Barreto Jr.,  
Maurício Bezerra Souza Jr., Argimiro Resende Secchi

**166**

**Análise técnico-econômica e cromatografia  
em contracorrente na purificação de biofármacos**

João Henrique Picado Madalena Santos, Larissa Pereira Brumano,  
Adalberto Pessoa Junior

**204**

**Desenvolvimento de processos de produção de biofármacos  
de acordo com Quality by Design (QbD)**

Francisco Vitor Santos da Silva

**232**

**Aplicação de sistemas bifásicos no particionamento  
e purificação de bioativos farmacêuticos**

Filipe Smith Buarque, Paulo Sérgio Santos Sobral, Kênia Marcatti Sousa,  
Paula Gabrielle Campos Gomes, Ranyere Lucena de Souza, Álvaro Silva Lima

**267**

**Sobre os autores**

**À ciência e sua linda trajetória para salvar a humanidade.**

## AGRADECIMENTO

A escrita de um livro redigido a tantas mãos requer, para além do ato de pesquisar, um carinho com a ciência e com os leitores que transcendem ao ato de apresentar conceitos. Portanto, nossos sinceros agradecimentos aos co-autores dos diferentes capítulos e suas instituições de ensino e pesquisa, que apoiaram e apostaram na comunicação do conhecimento que esse livro se propõe. Aos órgãos de fomento, aqui expressamos nosso carinho ao CNPq e à CAPES que mais próximos estiveram dos pesquisadores aqui envolvidos. Especialmente agradecemos à Universidade Tiradentes na pessoa do Prof. Jouberto Uchôa de Mendonça pelo incentivo à educação superior no estado de Sergipe, Alagoas e Pernambuco - Brasil e pelo apoio aos diversos mestres e doutores que abrigou e abriga nos seus diferentes Campi.

## PREFÁCIO

Por diversas razões o desenvolvimento da ciência e da tecnologia em biofármacos e fármacos sintéticos tem sido apontado como um aspecto dominante no século XXI em relação ao impacto no progresso social e econômico da humanidade. Esse desenvolvimento encontra diversos desafios e oportunidades a serem enfrentados nessa área do conhecimento visando os benefícios da biotecnologia aplicada especialmente na área dos cuidados com a saúde. Destacamos nesse campo de atividade as pesquisas e o projetos de processos na produção de antibióticos e antivirais, fármacos para o tratamento de doenças imunológicas, medicamentos para doenças cardiovasculares e fármacos para o sistema nervoso central, sistema gastrointestinal e tratamento do câncer além de analgésicos entre diversos outros.

O alto valor agregado dos produtos já obtidos ou em elaboração atualmente tem demonstrado a importância de altos investimentos, com um retorno inegável para a sociedade e possibilitando evidente melhoria da qualidade de vida para a população das nações modernas. Devido às características de obtenção de misturas complexas oriundas de biorreatores e reatores químicos de síntese, é constatado na literatura dessa área que as etapas de recuperação, separação e purificação de produtos farmacêuticos respondem geralmente por uma faixa de 60% a 80% dos custos de produção.

A busca de novas tecnologias e métodos que incorporam recentes inovações em operações de separação acarreta melhorias consideráveis nos preços e qualidade dos medicamentos, que são intensamente requeridos. Desse modo o sucesso comercial dos produtos mencionados é altamente dependente dos métodos denominados de “downstream” e biosseparação. O estudo desses métodos é especialmente relevante na ampliação de escala dos processos de produção levando-se em conta as necessidades atuais no uso desses fármacos.

O potencial de mercado e o aumento das diversas tendências na comercialização de biofármacos e de fármacos sintéticos são imensos. Considerando apenas as 10 maiores empresas farmacêuticas do mundo tem-se uma estimativa em 2020 de um valor de vendas totais de 800 bilhões de dólares ao ano com lucros líquidos estimados em 150 bilhões de dólares ao ano. Os investimentos em pesquisa e desenvolvimento se situam geralmente em 25% do lucro líquido.

A realidade atual dos principais métodos de divulgação das pesquisas, desenvolvimento e inovações em todas as áreas do conhecimento utiliza as publicações em artigos de periódicos e em patentes. Mesmo considerando a efetividade dos veículos citados, enfatizamos que a comunicação de resultados com organização em formato de coletâneas de Capítulos dedicados à apresentação de resultados de modo didático ainda encontra espaço importante para a formação de recursos humanos no nosso país.

Um conjunto dos resultados apresentados nesse volume se refere à separação de moléculas quirais, que se distinguem em várias aplicações como fármacos. A área farmacêutica tem mostrado um número crescentemente importante de aplicações de separações cromatográficas quirais.

Nos Capítulos 1, 2 e 3 são oferecidos estudos de casos da separação com o método cromatográfico contínuo que oferece a vantagem de fornecer os dois enantiômeros requeridos em quantidades adequadas para os testes clínicos comparativos, além de ser também largamente aplicado para fármacos que não são facilmente acessíveis por rotas enantioseletivas.

O Capítulo 4 apresenta a separação cromatográfica dos enantiômeros do praziquantel em processo contínuo e em batelada. O praziquantel é utilizado no tratamento da esquistossomose. e se apresenta sob a forma de uma mistura racêmica onde apenas um dos seus enantiômeros possui ação farmacológica efetiva.

No Capítulo 5 é realizado um estudo técnico-econômico para a purificação da uricase, que é uma enzima utilizada como biofármaco no tratamento e prevenção da gota, a qual é uma doença inflamatória que acomete sobretudo as articulações, São utilizadas duas técnicas de purificação distintas: cromatografia em contracorrente (CCC) e sistemas aquosos bifásicos.

O Capítulo 6 trata apresenta o estudo de processos de produção de biofármacos de acordo com o enfoque denominado *Quality by Design* (QbD ou “Qualidade por Projeto”). Inicialmente, serão explorados o contexto comercial e o cenário regulatório que levaram as principais agências reguladoras internacionais a promoverem QbD como estratégia de desenvolvimento de processos de produção de medicamentos.

No Capítulo 7 temos a técnica promissora dos sistemas aquosos bifásicos, os quais podem ser formados em meio aquoso com teor de água superior à 50% (m/m) nas fases coexistentes. Duas outras possibilidades surgem quando a premissa de elevado teor de água é quebrada surge os sistemas bifásicos, ou quando há a substituição integral da água por etanol dando origem aos sistemas etanólicos bifásicos. Neste sentido, apresenta-se aqui o arcabouço teórico da formação dos sistemas e seus diagramas, seguido da aplicação no particionamento, concentração e purificação de diferentes biomoléculas com aplicação na indústria farmacêutica.

Um aspecto relevante dos fundamentos e metodologias que fazem parte dos diversos Capítulos mencionados é que poderão ser adaptados à separação e purificação de outras moléculas de interesse a partir de dados a serem obtidos em laboratório adaptados às características da nova mistura a ser abordada.

Os Organizadores

# 1

## Separação cromatográfica de produtos farmacêuticos: motivação e fundamentos

Cesar Costapinto Santana<sup>1,2</sup>

Tamires dos Reis Menezes<sup>1</sup>

Juliana Faccin De Conto Borges<sup>1</sup>

Silvia Maria Egues Dariva<sup>1</sup>

1 Universidade Tiradentes –  
Av. Murilo Dantas 300, Farolândia. Aracaju Sergipe, Brasil. 49032-490.

2 Universidade Estadual de Campinas –  
Cidade Universitária Zeferino Vaz, Barão Geraldo. Campinas-São Paulo,  
Brasil. 13083-872.



# RESUMO

Apresentamos nesse capítulo a motivação, os principais fundamentos físico-químicos relacionados à separação cromatográfica de fármacos quirais e a aplicação na separação dos enantiômeros do fármaco mitotano em coluna cromatográfica. Dentre os aspectos básicos para a compreensão do tema estão a adsorção e sua relação com a cromatografia, a descrição de fases estacionárias quirais e a aplicação de fases sólidas baseadas em sílica e polissacarídeos para a resolução enantiomérica efetiva do mitotano. É desenvolvida também a quantificação completa dessa separação visando a aplicação em processo cromatográfico preparativo. O domínio desses fundamentos enseja a extensão do método cromatográfico visando a ampliação da escala da separação com a utilização de processos contínuos com múltiplas colunas. Os aspectos quantitativos e tecnológicos da ampliação de escala serão explorados em capítulos adicionais dessa obra com a fundamentação dos processos de separação contínua e do estudo de casos de separação cromatográfica contínua incluindo também a resolução de outras misturas racêmicas.

## 1.1 INTRODUÇÃO

### 1.1.1 Princípios Gerais de Estereoquímica e Quiralidade

Considerando-se o campo das moléculas orgânicas, a denominação de isômeros (do grego *iso* = mesmo e *meros* = parte) foi cunhada em 1806 em livro editado pelo químico Jons Jacob Berzelius, professor de medicina, farmácia e botânica no Instituto Karolinska da Suécia, após realizar uma síntese e observar compostos com mesma fórmula molecular, porém com propriedades químicas e físicas diferentes. Berzelius citou que, apesar da mesma composição química, os átomos estavam dispostos de maneira diferente em tais compostos. Na Tabela 1.1 está apresentada uma classificação moderna dos tipos de isomeria e suas respectivas descrições.

Em 1812 o físico francês Jean Baptiste Biot observou que cristais de quartzo são hemiédricos, indicando que certas facetas dos cristais podem ser dispostas de modo a se obter espécies que não podem ser sobrepostas. O autor estendeu as observações para moléculas orgânicas em estado líquido e observou que moléculas de mesma fórmula química desviavam o plano de luz polarizada de forma diferente. As moléculas que desviam a luz polarizada para a esquerda (sentido anti-horário) são chamadas de levógiras e são identificadas com o sinal negativo (-), já as moléculas que desviam a luz polarizada para a direita (sentido horário) são denominadas dextrógiras, identificadas com o sinal positivo (+). O astrônomo britânico John Friedrich Heschel observou em 1822 uma relação entre o hemiedrismo e a rotação ótica e o cristalógrafo alemão Eilhard Mitscherlich anunciou em 1844 a descoberta que o tartarato de sódio e amônio e o paratartarato de sódio e amônio não apenas tinham a mesma fórmula química mas eram também idênticos em todos os aspectos, exceto um: as soluções do tartarato faziam o plano da luz polarizada girar para a direita, enquanto as soluções do paratartarato não exerciam efeito sobre a luz polarizada. Desse modo Mitscherlich criou um desafio para a explicação das suas observações que perdurou por mais de 4 anos.

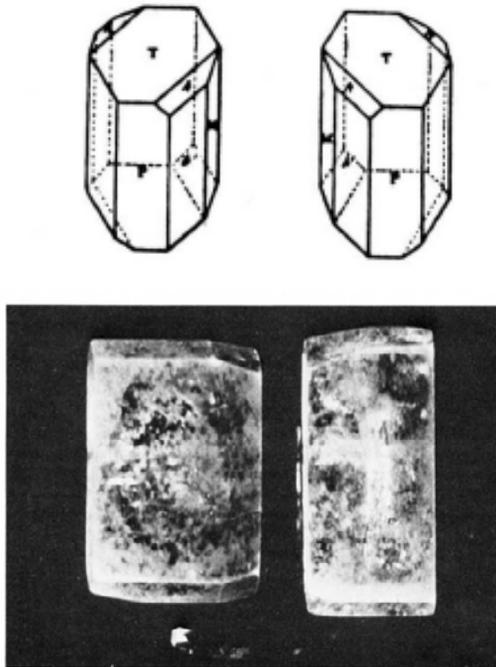
Uma das principais contribuições de Louis Pasteur à ciência ocorreu em 1848 quando obteve sucesso na separação manual de cristais do sal tartarato de sódio e amônia nas formas (+) e (-) a partir da mistura racêmica. Os esquemas e fotografia originais dos sais estão mostrados na Figura 1.1.

**Tabela 1.1.** Esquema representativo dos tipos de isomerias e suas definições.

Classificação	Tipos	Descrição
Isomeria Constitucional (ou isomeria planar)	Isomeria de cadeia	Os isômeros pertencem à mesma função orgânica, mas diferem no tipo de cadeia.
	Isomeria de posição	Os isômeros pertencem à mesma função orgânica e possuem o mesmo tipo de cadeia, mas diferem na posição de um grupo funcional, de uma instauração ou de uma ramificação.
	Isomeria de função	Os isômeros diferem quanto à função orgânica.
	Isomeria de compensação	Os isômeros pertencem à mesma função orgânica e apresentam o mesmo tipo de cadeia, porém diferem na posição de um heteroátomo.
	Tautomeria	Tipo especial de isomeria de função, na qual os isômeros coexistem em equilíbrio dinâmico em solução.
Isomeria espacial (ou Estereoisomeria)	Isomeria geométrica	Tipo de isomeria que ocorre em alcenos e compostos cíclicos como resultado da orientação espacial dos substituintes ligados aos carbonos da ligação dupla ou pertencentes ao ciclo.
	Isomeria óptica	Os isômeros desviam o plano da luz polarizada de forma diferente.

Pasteur verificou que a potência da rotação ótica da luz polarizada é causada pela dissimetria, ou seja, a dissimilaridade do cristal ou da molécula e sua imagem no espelho, como observado no caso dos cristais do sal tartarato de sódio e amônia. É importante observar que Biot, na época presidente da Academia de Ciências da França, solicitou a Pasteur que repetisse os experimentos no seu laboratório e em sua presença, o que pode ser considerada como a primeira revisão presencial de um trabalho científico.

**Figura 1.1.** Esquema e fotos do trabalho original de Pasteur (1848) com cristais de tartarato de sódio e amônia com a forma levógira l (-) à esquerda e a forma destrógira d (+) à direita. A forma racêmica (+) (-) está na base da fotografia. Fonte: Adaptado de Kauffman e Myers, 1975.

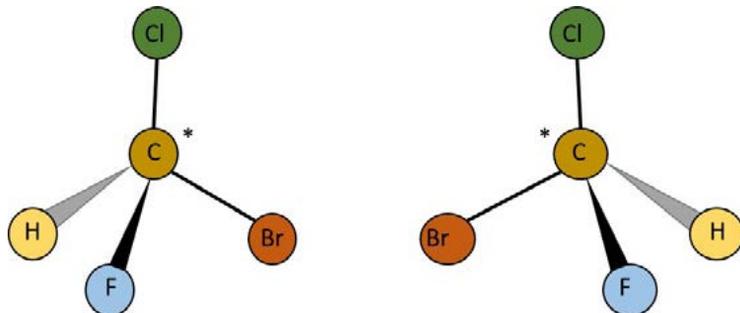


Pasteur verificou que a potência da rotação ótica da luz polarizada é causada pela dissimetria, ou seja, a dissimilaridade do cristal ou da molécula e sua imagem no espelho expresso no caso dos cristais do sal tartarato de sódio e amônia pela presença das faces hemiédricas. É importante observar que Biot, na época presidente da Academia de Ciências da França, solicitou a Pasteur que repetisse os experimentos no seu laboratório e em sua presença, o que pode ser considerada como a primeira revisão presencial de um trabalho científico.

Os símbolos (+) e (-) são utilizados para expressar uma mistura racêmica, formada por dois enantiômeros sem atividade óptica. Em contrapartida, os compostos opticamente ativos, que não são imagens especulares entre si, são designados diastereoisômeros. Outra identificação é dada pelos prefixos (R) ou (S). R (do latim *rectus* = direita) e S (do latim *sinister* = esquerda). Os estereoisômeros possuem orientação espacial dos átomos diferentes, mas idênticos arranjos de ligação conectando seus átomos. Enantiômeros são pares de estereoisômeros, portanto, não se sobrepõem e são chamados de compostos quirais.

Uma forma de reconhecer a existência de um par de enantiômeros é verificar se a molécula contém um átomo tetraédrico ao qual se ligam quatro diferentes átomos ou grupos de átomos. Este átomo é denominado de centro de quiralidade assinalado com asterisco (Figura 1.2), frequentemente marcado com um asterisco na estrutura molecular.

**Figura 1.2.** Carbono com quatro átomos diferentes ligados, que é uma das razões da quiralidade.



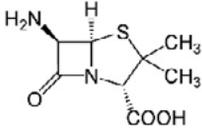
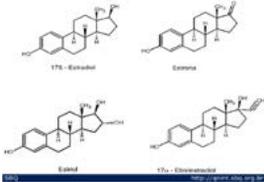
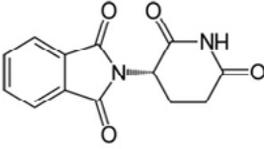
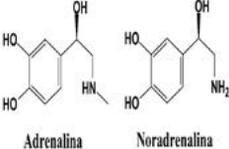
## 1.1.2 Motivação à Separação de Enantiômeros

Moléculas quirais apresentam propriedades físico-químicas de extrema importância para a atividade terapêutica de fármacos e outras substâncias bioativas. Sistemas biológicos, por serem constituídos por moléculas quirais, realizam reconhecimento tridimensional de estereoisômeros de forma altamente eficaz, permitindo distinguir entre os enantiômeros de uma dada molécula, seja ela um fármaco ou um metabólito endógeno, levando em geral a respostas farmacológicas, biológicas ou terapêuticas distintas. O impacto da quiralidade das moléculas orgânicas repercute profundamente em áreas de interesse social e econômico, tais como no desenvolvimento de novos fármacos, aditivos alimentares e fragrâncias, por exemplo.

Alguns exemplos de diferenças nas propriedades dos enantiômeros estão apresentados na Tabela 1.2, podendo esse comportamento implicar em efeitos biológicos, e intensidades distintas, ou mesmo o seu efeito estar limitado a apenas um dos seus enantiômeros.

Desta forma, a pureza enantiomérica de novas moléculas sintéticas é fundamental na pesquisa e desenvolvimento de novas drogas. Portanto, enantiômeros de moléculas bioativas devem ser preparados e testados separadamente. Contrapondo-se à ideia de preparação química de um único estereoisômero bioativo (eutômero) por meio da catálise assimétrica, os estudos com novos fármacos frequentemente exigem a disponibilidade dos dois enantiômeros para estudos clínicos, conferindo aos métodos que permitem à preparação dos enantiômeros uma vantagem estratégica adicional.

**Tabela 1.2.** Exemplos de diferenças na atividade de pares enantioméricos

Fármacos	Estruturas dos Isômeros	Efeitos
Penicilamina		Enantiômero (-): antiartrítico Enantiômero (+): extremamente tóxico
Estrona		Enantiômero (+): hormona estrogênica Enantiômero (-): inativo
Talidomida		Enantiômero R: sedativo Enantiômero S: teratogênico
Adrenalina		Enantiômero (-): 20 vezes mais ativo

De posse destes conhecimentos, as agências reguladoras de medicamentos e alimentos começaram a se pronunciar sobre o assunto. Em 1992 a agência norte americana FDA (do inglês, *Food and Drug Administration*) publicou um documento intitulado *FDA's policy statement for the development of new stereoisomeric drugs* (declaração da política para o Desenvolvimento de novos medicamentos estereoisoméricos). Em 1998 foi a vez da agência reguladora canadense, Health Canada, publicar seu posicionamento em um guia intitulado *Stereochemical issues in chiral drug development* (questões estereoquímica no desenvolvimento de medicamentos quirais). Apesar de divergirem em alguns aspectos, quatro pontos comuns são de extrema importância entre as recomendações: os desenvolvedores devem reconhecer a ocorrência de quiralidade em novos fármacos, tentar separar

os estereoisômeros, determinar a contribuição de cada estereoisômero para a atividade de interesse, e selecionar a forma estereoisomérica que será proposta para a comercialização (Zeid et al., 2011).

Ainda não há no Brasil legislação específica sobre fabricação e comercialização de fármacos quirais publicada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), contudo se tem exigências relacionadas às características do insumo farmacêutico ativo (IFA). Estas exigências, a ANVISA solicita dados sobre a estereoquímica desses fármacos para aqueles que apresentam quiralidade. O principal dado cobrado é o teor dos estereoisômeros, quando a proporção dos mesmos possa comprometer a eficácia e a segurança do medicamento (Brasil, 2016).

Em virtude da necessidade de se conhecer a atuação individual dos enantiômeros nos organismos, e avaliar suas ações farmacológicas, surgiram nos últimos anos formas de se obter os fármacos enantiomericamente enriquecidos. As rotas para obtenção de enantiômeros separados podem ser classificadas em 4 grupos: semi-síntese quiral que utiliza compostos opticamente puros presentes na natureza, contendo o esqueleto básico do composto de interesse; separação da mistura racêmica; métodos de síntese assimétrica biológica; e, síntese química assimétrica. Dentre estes, o método de separação de misturas racêmicas em seus enantiômeros apresenta-se como um campo em pleno desenvolvimento e com extraordinário potencial. Neste caso, os métodos cromatográficos apresentam-se como alternativa bastante viável e eficiente (Francotte, 2001).

### 1.1.3 Cromatografia para Separação de Enantiômeros

O campo farmacêutico tem mostrado um número expressivo de aplicações de separações cromatográficas quirais. A utilização de fases estacionárias quirais (FEQ), como ferramenta analítica para a determinação da composição de misturas enantioméricas em estudos biológicos e farmacocinéticos, é atualmente uma técnica bem estabelecida. No entanto, a aplicação do método na escala preparativa para a produção de materiais opticamente ativos, em quantidades suficientes para testes

biológicos, estudos toxicológicos e posteriormente, testes clínicos, está ganhando ampla aceitação. Com isso, o método cromatográfico oferece a vantagem de fornecer ambos enantiômeros requeridos para os testes comparativos, além de ser também largamente aplicado para drogas que não são facilmente acessíveis por uma rota sintética.

Durante a fase de testes preliminares de novas drogas quirais, a técnica de cromatografia permite acesso rápido aos enantiômeros puros e podem vantajosamente substituir a elaboração, frequentemente prolongada, de uma síntese enantioselectiva. Uma grande variedade de drogas racêmicas já tem sido separada em FEQs, cobrindo diferentes classes terapêuticas de compostos, tais como: analgésicos, tranquilizantes, diuréticos, anticonvulsivos e antineoplásicos.

## 1.2 FUNDAMENTOS

### 1.2.1 Isotermas de Adsorção

O estudo do equilíbrio de fases é a parte da termodinâmica que se preocupa com a composição de equilíbrio de duas fases e a influência de vários parâmetros nessa composição, como por exemplo temperatura e pressão segundo Guiochon et al. (1994). Para o caso de sistemas de fases usado em cromatografia líquida, uma das fases é a solução de eluição e a outra o sólido adsorvente.

A adequada simulação de um processo de separação cromatográfica requer, principalmente, informações confiáveis de como os componentes da mistura a serem separados se distribuirão, em condições de equilíbrio, entre a fase móvel e a fase estacionária. Este tipo de informação é obtido pelas isotermas de adsorção.

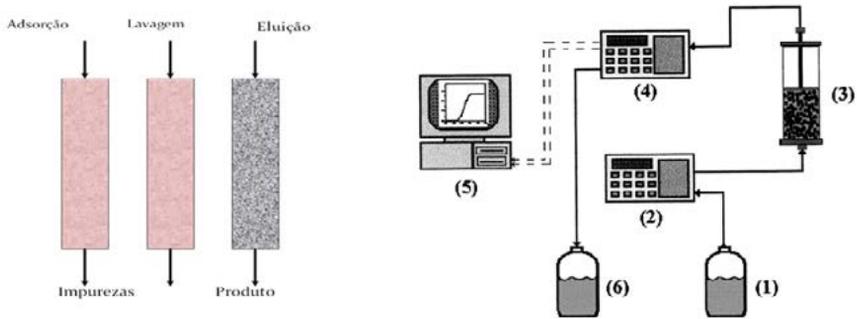
Em geral, isotermas de adsorção podem ser determinadas apenas experimentalmente. Por esta razão, há atualmente um largo número de métodos experimentais disponíveis. Sua aplicação apropriada e eficiente ainda está longe de se tornar um trabalho de rotina. Decidir qual método é apropriado para determinar as isotermas de adsorção, para um problema específico de separação, é uma tarefa difícil, uma vez que não se trata de uma determinação direta da quantidade de soluto adsorvida e sim de considerações de equilíbrio. Normalmente, apenas as isotermas para um único soluto são determinadas por meio de experimentos e as isotermas competitivas são, então, preditas usando modelos de isotermas. No entanto, observa-se com frequência que os conceitos teóricos disponíveis oferecem apenas uma precisão limitada e a determinação experimental dos dados de equilíbrio multicomponente é recomendada. Um aspecto importante para escolher um método experimental satisfatório é, frequentemente, se e quanto dos componentes puros estão disponíveis para realizar as medidas segundo recomendação de Seidel-Morgenstern (2004).

## 1.2.2 Análise Frontal

É o método mais comumente utilizado para a determinação de isotermas, pela sua precisão e relativa simplicidade. Trata-se da análise das respostas de pulsos grandes (alta quantidade de soluto) aplicados ao sistema de separação.

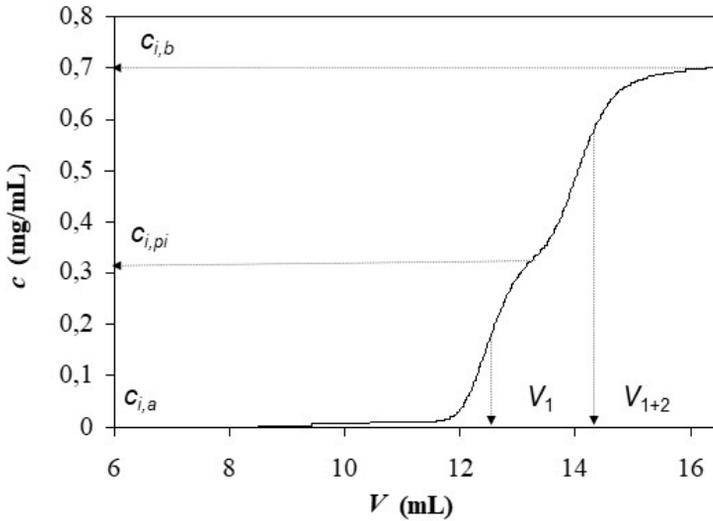
Visando estabelecer as condições de operação do sistema de adsorção e eluição e o efeito da temperatura e da pressão no desempenho do sistema são necessários dados experimentais da cinética e da isoterma de adsorção a pressão atmosférica e a pressões elevadas. Na Figura 1.3 é mostrado um diagrama das etapas de adsorção, lavagem e eluição e o esquema operacional de unidade experimental para a obtenção de dados pelo método da análise frontal.

**Figura 1.3.** Esquema operacional de processo de adsorção e eluição em colunas para a obtenção da curva de ruptura e da isoterma de adsorção.



A determinação das isotermas de adsorção pelo método da análise frontal é o problema inverso comparado à predição das curvas de ruptura a partir de isotermas conhecidas. A teoria do equilíbrio torna-se uma conveniente ferramenta para prever características de tais curvas, como: concentração no platô intermediário e tempo de retenção das frentes de adsorção. Apenas esses dados precisam ser determinados experimentalmente para resolver o problema. Este conceito é aplicado como uma ferramenta padrão para determinar isotermas para um único soluto, a partir da dependência da concentração com o tempo de retenção na região frontal à curva de ruptura. Para isotermas multicomponentes, as curvas de ruptura também podem ser usadas, mas com algumas restrições. A curva de ruptura para uma mistura binária tem duas ondas separadas pelo platô intermediário como apresentado na Figura 1.4.

**Figura 1.4.** Curva de ruptura para uma mistura binária com as indicações dos volumes de retenção e das concentrações nos estágios de uma eluição a uma dada concentração de alimentação.



Se a condição inicial para uma curva de ruptura é que a coluna esteja em equilíbrio com uma concentração finita de alimentação, os tempos de eluição dessas duas ondas dependem dessas concentrações iniciais. Assim, é necessário determinar também a composição da solução que está eluindo pela coluna durante o platô intermediário ou adotar como condição inicial o equilíbrio com a fase móvel pura, no caso de apenas o componente puro menos retido ser eluído durante o platô intermediário segundo a recomendação de Mihlbachler et al. (2002).

Para determinar vários pontos da isoterma, são realizadas sucessivas mudanças na concentração de alimentação da coluna, resultando em diferentes curvas de ruptura. Os dados experimentais resultantes são usados na Equação 1.1.

$$q_i = \frac{(V_{1+2} - V_o)(c_{i,b} - c_{i,a}) - (V_{1+2} - V_1)(c_{i,p} - c_{i,a})}{V_{ads}} \quad (1.1)$$

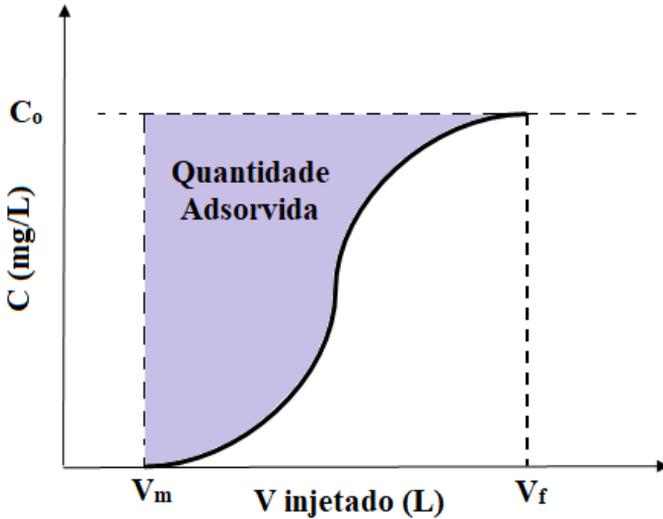
onde:  $V_o$ ,  $V_1$ ,  $V_{1+2}$  e  $V_{ads}$  são o volume morto do sistema, volume de retenção da primeira e da segunda frentes de adsorção e volume de adsorvente presente na coluna, respectivamente.  $c_{i,a}$  e  $c_{i,b}$  são as concentrações do componente  $i$  na alimentação da coluna em equilíbrio inicialmente (anterior a  $t=0$ ) e atrás da segunda frente de adsorção (platô superior).  $c_{i,pi}$  é a concentração do componente  $i$  no platô intermediário.

Para os dados experimentais em colunas, o balanço de massa é representado pela equação 1.2, resultante do cálculo da massa adsorvida pela integração da curva de ruptura. Esse procedimento está esquematizado na Figura 1.5.

$$q = \frac{C_o(V_f - V_m) - \int_{V_m}^{V_f} C dV}{m_{ads}} \quad (1.2)$$

onde  $m_{ads}$  é a massa de adsorvente,  $C_o$  a concentração inicial,  $V_m$  é o volume morto,  $V_f$  é o volume final e  $q$  é a quantidade de soluto adsorvido.

**Figura 1.5.** Obtenção da quantidade adsorvida na fase sólida no processo de adsorção por integração da área indicada.



## 1.2.3 Modelos de Isotermas de Adsorção

### 1.2.3.1. Modelo Linear

Caso a concentração dos solutos na fase móvel seja baixa, o equilíbrio de adsorção pode ser descrito por uma relação linear entre as concentrações nas fases estacionária e móvel ( $q_i = H e_i \cdot c_i$ , em que  $H e$  se trata da constante de Henry para o componente  $i$ ).

### 1.2.3.2. Modelo de Langmuir Competitivo

O modelo de Langmuir competitivo considera que o processo de adsorção acontece em uma superfície composta de um número fixo de sítios de adsorção de igual energia, uma molécula sendo adsorvida por sítio até que a cobertura da monocamada seja alcançada. Este modelo

é o mais frequentemente utilizado para descrever adsorção não-linear, embora seja assumido que é um modelo muito simples para informar a adsorção em fases estacionárias quirais. A isoterma de Langmuir corresponde a uma cinética de adsorção homogênea e é expressa matematicamente pela Equação 1.3.

$$q_i^* = q_s \frac{b_i c_i}{1 + b_1 c_1 + b_2 c_2}; \quad i = 1, 2 \quad (1.3)$$

onde:  $q_s$  é a capacidade de saturação da monocamada do adsorvente e  $b_i$  é a constante de equilíbrio de adsorção ou coeficiente de distribuição. A constante de Henry ( $He_i$ ) para o componente  $i$  é dada pelo produto  $q_s \cdot b_i$ .

A isoterma de Langmuir é conveniente aplicável para análise quantitativa de processos de adsorção e tem uma base física, distintamente das equações empíricas, como o modelo de Freundlich, que não tem nenhuma justificativa teórica significativa. A grande vantagem deste modelo é o pequeno número de parâmetros requeridos e a simplicidade de sua derivação. De fato, somente três parâmetros são necessários para descrever adsorção competitiva: duas constantes de equilíbrio e a capacidade de saturação.

### 1.2.3.3. Modelo de bi-Langmuir Competitivo

Quando enantiômeros são separados em uma FEQ, é esperado que a fase estacionária seja heterogênea, com uma distribuição de energia bimodal. O modelo de isoterma bi-Langmuir assume que a superfície da FEQ contém dois diferentes tipos de sítios: sítios não-seletivos, que retêm ambos os enantiômeros com a mesma energia de adsorção; e, sítios enantiosseletivos que interagem diferentemente com estes dois enantiômeros, ligando-se a eles com diferentes energias (com igual ou diferente capacidade de saturação). Assim, as constantes de equilíbrio dos dois enantiômeros nos sítios não-seletivos são iguais e o modelo

bi-Langmuir possui apenas cinco parâmetros neste caso. Este modelo pode ser considerado como uma extensão do modelo competitivo de Langmuir quando estes dois tipos de sítios coexistem na superfície da fase estacionária, sendo descrita através da Equação 1.4.

$$q_i^* = q_{ns} \frac{b_{ns,i} c_i}{1 + b_{ns,i} (c_1 + c_2)} + q_s \frac{b_{s,i} c_i}{1 + b_{s,1} c_1 + b_{s,2} c_2}; \quad i = 1,2 \quad (1.4)$$

onde:  $b_{ns,i}$  é a constante de equilíbrio para a adsorção nos sítios não-seletivos,  $b_{s,i}$  é a constante de equilíbrio para a adsorção nos sítios enantiosseletivos,  $q_{ns}$  é a capacidade de saturação dos sítios não-seletivos e  $q_s$  é a capacidade de saturação dos sítios enantiosseletivos

## 1.2.4 Método dos Momentos

A análise dos momentos é uma ferramenta usual para determinação dos coeficientes de dispersão axial e difusão, e até mesmo das propriedades de um leito fixo, como suas porosidades, a partir de experimentos de pulsos cromatográficos segundo observações de Miyabe e Suzuki (1992). Esta técnica consiste na análise da concentração do soluto como uma função do tempo na saída do leito fixo em resposta à concentração do soluto no pulso na entrada do leito. Para soluções diluídas, a curva de equilíbrio sólido-líquido pode ser representada por uma reta (lei de Henry). A inclinação desta reta pode ser determinada a partir do primeiro momento de um pulso do soluto, o qual é associado ao tempo de retenção do soluto. Parâmetros de transferência de massa podem ser obtidos a partir do segundo momento. O método de análise dos momentos é usado para determinar as constantes de adsorção e a porosidade do leito.

Por definição dos momentos de uma distribuição, o  $n$ -ésimo momento do perfil de banda na saída do leito cromatográfico de comprimento  $z = L$  é calculado pela Equação 1.5 desenvolvida por Guiochon et al. (1994).

$$M_n = \int_0^{\infty} c(t, L) \cdot t^n dt \quad (1.5)$$

onde  $t$  é o tempo,  $L$  o comprimento da coluna,  $C$  é concentração e  $M_n$  é o  $n$ -ésimo momento.

O  $n$ -ésimo momento absoluto ou normalizado é expresso pela Equação 1.6.

$$\mu_n = \frac{M_n}{M_0} = \frac{\int_0^{\infty} c(t, L) \cdot t^n dt}{\int_0^{\infty} c(t, L) dt} \quad (1.6)$$

onde  $M_0$  é o momento de ordem zero.

E o  $n$ -ésimo momento central é dado pela Equação 1.7.

$$\bar{\mu}_n = \frac{\int_0^{\infty} c(t, L) \cdot (t - \mu_1)^n dt}{\int_0^{\infty} c(t, L) dt} \quad (1.7)$$

Onde  $\mu_1$  é o primeiro momento absoluto de um pico cromatográfico.

O primeiro momento absoluto de um pico cromatográfico  $\mu_1$ , é relacionado ao tempo de retenção do pico e conseqüentemente, à força de ligação, por exemplo. A constante de equilíbrio é calculada pela Equação 1.8, segundo Arnold et al. (1985a).

$$\mu = t_R = \frac{L}{u_0} [\varepsilon + (1 - \varepsilon)\varepsilon_p + (1 - \varepsilon)(1 - \varepsilon_p)K_p] + \frac{t_{inj}}{2} \quad (1.8)$$

onde:  $u_0$  é a velocidade superficial de escoamento da fase móvel e  $t_{inj}$ , o tempo de injeção.

O segundo momento central  $\bar{\mu}_2$  é relacionado ao espalhamento do pico, causado por desvios do equilíbrio. Quando o pico cromatográfico de eluição for gaussiano (Equação 1.9),  $\bar{\mu}_2$  torna-se igual à variância  $\sigma^2$

$$\bar{\mu}_2 = \sigma^2 = \frac{2L}{u} \left\{ \frac{D_L}{u^2} \left[ 1 + \left( \frac{\varepsilon}{1 - \varepsilon} \right) \frac{1}{K} \right]^2 + \left( \frac{\varepsilon}{1 - \varepsilon} \right) \frac{1}{K_m} \right\} + \frac{t_{inj}^2}{2} \quad (1.9)$$

onde:  $u$  é a velocidade intersticial e  $K$  é dado pela Equação 1.10.

$$K = \varepsilon_p + (1 - \varepsilon_p)K_p \quad (1.10)$$

onde  $\varepsilon_p$  é a porosidade do adsorvente.

Para o caso em que o soluto é um composto que não sofre adsorção na fase estacionária ( $K_p = 0$ ), o primeiro momento fica simplificado de acordo com a Equação 1.11, utilizada para a determinação das porosidades total e do leito.

$$\mu_1 = t_R = \frac{L}{u_0} [\varepsilon + (1 - \varepsilon)\varepsilon_P] + \frac{t_{inj}}{2} \quad (1.11)$$

## 1.2.5 Altura de Colunas Equivalente a um Prato Teórico

A eficiência de separação de um processo cromatográfico aumenta à medida que o soluto flui através do leito recheado, devido ao maior número de interações do soluto entre a fase móvel e a fase estacionária. Uma etapa na qual a molécula alcança o equilíbrio é equivalente a um estágio de equilíbrio, também designado por prato.

A altura equivalente a um prato ( $H$ ) mede a eficiência das condições cromatográficas através dos tempos de retenção obtidos e do alargamento de bandas. Este parâmetro é normalmente utilizado para avaliar o desempenho da coluna, admitindo-se uma escolha adequada das condições (Cass e Degani, 2001). Para um sistema com isoterma de adsorção linear, ou seja, sob condições de diluição infinita, a eficiência de uma coluna cromatográfica pode ser avaliada a partir de  $H$ , de acordo com a Equação 1.12. Baixos valores de  $H$  significam maior eficiência da coluna, que resulta em um alto valor do número de pratos ( $N_p$ ).

$$H = \frac{\sigma^2 \cdot L}{\mu^2} = \frac{L}{N_p} \quad (1.12)$$

onde:  $L$  é o comprimento da coluna,  $\mu$  é a viscosidade e  $N_p$  é calculado pela Equação 1.13.

$$N_p = 5,54 \cdot \left( \frac{t_{R,i}}{w_{h,i}} \right)^2 \quad (1.13)$$

onde  $t_{R,i}$  e  $w_{h,i}$  são o tempo de retenção do componente  $i$  e a largura da base do pico cromatográfico.

Combinando-se as Equações 1.7 e 1.8 com a 1.11 tem-se como resultado a Equação 1.14.

$$H = \frac{2D_L}{u} + 2u \left( \frac{\varepsilon}{1-\varepsilon} \right) \frac{1}{K_m} \left[ 1 + \left( \frac{\varepsilon}{1-\varepsilon} \right) \frac{1}{K} \right]^{-2} \quad (1.14)$$

onde:  $D_L$  é o coeficiente de dispersão axial da coluna;  $k_m$  o coeficiente de transferência de massa global

Na Equação 1.14 o valor da constante  $K$  é dada pela Equação 1.15

$$K = \varepsilon_p + (1 - \varepsilon_p) H \quad (1.15)$$

onde:  $H$  a constante de Henry.

De acordo com Guiochon et al. (1994), considera-se que a dispersão axial resulta de dois mecanismos diferentes, a saber: difusão molecular e difusão turbilhonar. Como primeira aproximação, estes efeitos se somam de forma que o coeficiente de dispersão seja representado pela Equação 1.16.

$$D_L = \gamma_1 D_m + \gamma_2 d_p u \quad (1.16)$$

onde:  $D_m$  é o coeficiente de difusão molecular,  $\gamma_1$  e  $\gamma_2$  são constantes que possuem normalmente valores 0,7 e 0,5 respectivamente, segundo Ruthven (1984).

A altura equivalente a um prato é função da geometria da coluna e empacotamento, das condições de operação, das propriedades do soluto e das interações do soluto com a fase móvel e com a fase estacionária. Para uma dada separação cromatográfica, o empacotamento da coluna e o soluto já são definidos,  $H$  é função da velocidade superficial de escoamento da fase móvel ( $u_o$ ) segundo Arnold et al. (1985a e 1985b). Isso permite obter informações acerca de fenômenos de transferência de massa. Geralmente é assumido que a transferência de massa em colunas cromatográficas consiste em vários processos, dentre os quais, os quatro principais normalmente considerados são: i) dispersão axial; ii) transferência de massa do fluido para partícula; iii) difusão intraparticular; e, iv) adsorção/dessorção.

O valor de  $H$  para uma coluna cromatográfica pode ser calculado, aproximadamente, pela equação de van Deemter (Equação 1.17).

$$H = A + \frac{B}{u_o} + C.u_o \quad (1.17)$$

onde:  $A$ ,  $B$  e  $C$  são coeficientes empíricos de acordo com Guiochon (2002). O termo  $A$  refere-se ao alargamento dos picos devidos aos caminhos tortuosos seguidos pelas moléculas da amostra, e  $u_o$  é a velocidade superficial

Para minimizar este termo é necessário usar colunas com diâmetros internos pequenos, bem recheadas e partículas com tamanho pequeno e uniforme. O termo  $B$  está relacionado com a difusão molecular do soluto na fase móvel, podendo ser minimizado trabalhando-se com a massa específica da fase móvel. O termo  $C$  é uma função dos efeitos de transferência de massa do soluto entre as fases móvel e estacionária. Neste caso, vazões menores de fase móvel minimizam estes efeitos.

O primeiro termo da Equação 1.17, referente à difusão molecular para a dispersão axial, geralmente é pouco pronunciado perante o

segundo termo, sendo normalmente percebido a baixas velocidades de escoamento de fluido. Neste caso, uma equação modificada de van Deemter (Equação 1.18) é originada a partir da Equação 1.16.

$$H = A + C.u_0 \tag{1.18}$$

onde: A e C são coeficiente, dados pelas Equações 1.19 e 1.20, respectivamente.

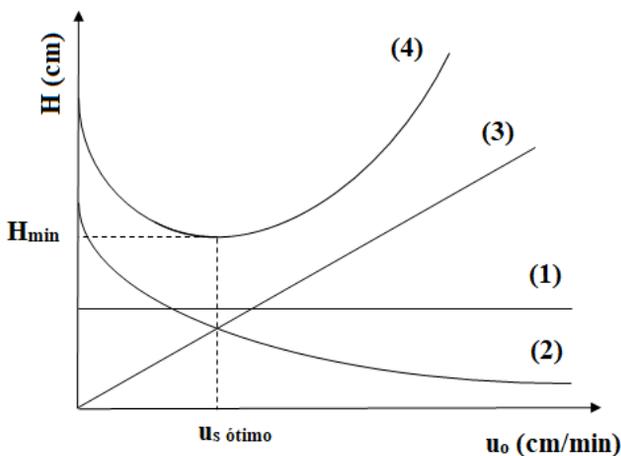
$$A = 2\gamma_2 d_p \tag{1.19}$$

E

$$C = 2 \left( \frac{\varepsilon}{1 - \varepsilon} \right) \frac{1}{K_m} \left[ 1 + \left( \frac{\varepsilon}{1 - \varepsilon} \right) \frac{1}{K} \right]^{-2} \tag{1.20}$$

A Figura 1.6 mostra a variação de  $H$  com a velocidade superficial  $u_0$ . A curva 1 corresponde ao primeiro termo do segundo membro da Equação 1.16, sendo independente da velocidade superficial. A curva 3 apresenta-se como uma função linear da velocidade superficial e corresponde ao terceiro termo do segundo membro da Equação 1.16. A difusão molecular (representado pelo segundo termo do segundo membro da Equação 1.16) é inversamente proporcional à velocidade superficial, tratando-se da curva 2 e, por fim, a curva 4 se refere ao perfil que apresenta um valor de mínimo para a altura correspondente a um prato em uma dada velocidade superficial (denominada de ótima). Abaixo desta velocidade,  $H$  torna-se fortemente dependente dos efeitos de difusão e a altas velocidades, fortemente dependente do termo de transferência de massa de acordo com Sewell et al. (1988).

**Figura 1.6.** Variação de  $H$  com a velocidade superficial  $u_0$  de acordo com a equação de van Deemter.



## 1.3 ADSORÇÃO E CROMATOGRÁFIA COMO FERRAMENTAS DE PURIFICAÇÃO

### 1.3.1 Aspectos Gerais

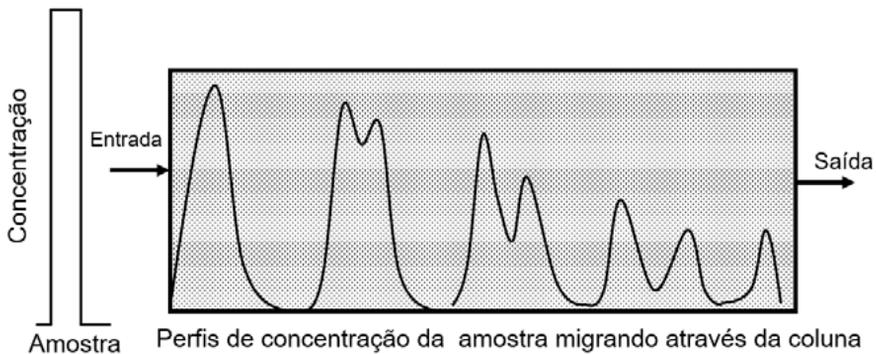
Os avanços na fabricação e purificação de produtos farmacêuticos trazem um grande impacto nas ciências da vida. A necessidade de isolar, separar e purificar moléculas importantes para as áreas farmacêutica, biomédica e outras da indústria biotecnológica, em geral, aparece como uma oportunidade de desenvolvimento da biosseparação, em etapas conhecidas como processos “*downstream*”. Essas etapas respondem por uma grande percentagem dos custos total do processo de fabricação, e portanto, se torna tema de grande discussão científica no campo das separações, cujo foco é a melhoria da seletividade entre os solutos de uma determinada mistura.

Os processos de adsorção e de cromatografia desempenham importante papel na biosseparação e estão baseados na afinidade diferencial

das várias moléculas dos solutos na transferência seletiva da superfície de um sólido (fase estacionária) para a fase fluida (fase móvel). A adsorção é um processo termodinamicamente espontâneo no qual energia é liberada durante o processo. Enquanto que eluição corresponde a remoção das moléculas da fase sólida.

As separações cromatográficas estão baseadas nos fenômenos de diferentes graus e tipos de interação entre os componentes da mistura da fase fluida a serem separados e a fase estacionária que está geralmente empacotada em uma coluna, resultando em diferentes velocidades de migração no leito fixo e, conseqüentemente, em diferentes tempos para cada componente sair da coluna. Um esquema desse processo para o caso de dois componentes na mistura líquida está mostrado na Figura 1.7.

**Figura 1.7.** Migração de dois componentes de uma amostra ao longo de uma coluna cromatográfica mostrando a separação paulatina.



Os métodos que utilizam a adsorção e a cromatografia apresentam geralmente baixo consumo energético devido ao uso de adsorventes apropriados que promovem a separação e purificação dos componentes em bases economicamente competitivas frente a outros processos de separação.

O domínio das técnicas cromatográficas na produção de fármacos ficou consolidados a partir de 1990, inclusive para larga escala (da ordem de Kg/ano e até de ton/ano). Publicações envolvidas com fundamentos

e aplicações de adsorção e cromatografia líquida em bioprocessos) colocam em perspectiva o grande potencial e numerosos uso dessas técnicas na área de separações e purificações.

Na cromatografia líquida convencional (CL) um pulso da mistura, denominada de alimentação, é injetado na coluna seguindo-se por uma entrada contínua do solvente, denominado de eluente. Considerando-se que com escolha apropriada da fase sólida os solutos migram a diferentes velocidades, esses solutos são separados à medida que migram na coluna. As bandas individuais são então coletadas como produtos nas portas de saída. Se ocorrer alguma superposição das bandas em algum tempo de saída a mistura pode ser reciclada ou descartada como resíduo. A obtenção de altas purezas (>99%) e altos rendimentos (>95%, por exemplo) são necessárias para uma completa separação das bandas, o que pode envolver altos consumos de solventes. Pode ocorrer que uma parte significativa da coluna não seja utilizada durante a operação em batelada o que pode implicar em processos com baixa eficiência, o que levou ao desenvolvimento de modos contínuos de operação, a serem tratados no Capítulo 2 desse livro.

## 1.3.2 Classificação dos Processos Cromatográficos

De modo a normalizar a nomenclatura dos processos e facilitar a comunicação entre os pesquisadores e usuários é utilizada na literatura de fundamentos e aplicações uma classificação desses processos, como mostrado na Tabela 1.3.

**Tabela 1.3.** Classificação da processos cromatográficos.

<b>Princípio da classificação</b>	<b>Nomenclatura</b>
Estado físico das duas fases	Cromatografia gás-líquido (CGL) / Cromatografia gás-sólido (CGS) / Cromatografia líquido-líquido (CLL)
Estado físico da fase móvel	Cromatografia gasosa (CG) / Cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC) / Cromatografia com fluido supercrítico (CFS)
Escala	Análítica / Preparativa / Produção
Modos de operação	Frontal / Descontínua / Contínua / Deslocamento / Múltiplas colunas / Eluição
Mecanismo da separação	Partição / Fase normal ou reversa / Troca de íons / Exclusão de tamanho / Afinidade
Equilíbrio das fases	Linear e Não linear

Na cromatografia frontal uma amostra é alimentada continuamente no leito de partículas sem adicional fase móvel, enquanto que na de deslocamento a amostra é injetada na forma de uma frente finita e a fase móvel contém um composto (o deslocador) retido mais fortemente do que os componentes da amostra. A cromatografia de eluição é caracterizada com uma amostra alimentada na forma de uma frente finita e a fase móvel é passada continuamente na coluna cromatográfica. A grande desvantagem das separações cromatográficas usuais consiste na descontinuidade do processo e na diluição do produto, conduzindo a baixos valores de produtividade.

## 1.4 FASES ESTACIONÁRIAS QUIRAIS BASEADAS EM POLISSACARÍDEOS

A fase estacionária quiral é responsável pela discriminação enantiomérica. Nas últimas duas décadas, inúmeros seletores quirais têm sido avaliados em relação à sua capacidade de resolução quiral e emprego em centenas de fases estacionárias quirais (FEQs). Dentre essas fases, aquelas que se mostraram mais promissoras, quanto à enantioseparação de uma ampla classe de compostos quirais, estão disponíveis comercialmente para separações em escala preparativa e são empregadas em aplicações diversas. Para a análise de fármacos quirais e seus metabólitos, a literatura destaca o sucesso das fases estacionárias quirais baseadas em derivados de polissacarídeos segundo Bonato et al. (2005).

### 1.4.1 Adsorventes Baseados em Polissacarídeos

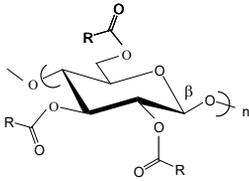
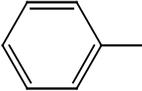
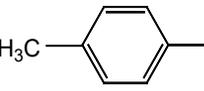
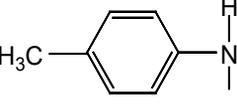
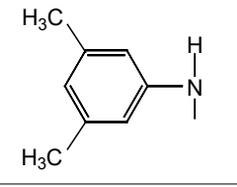
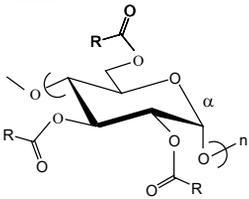
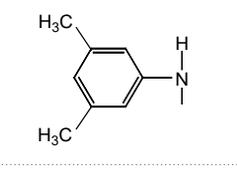
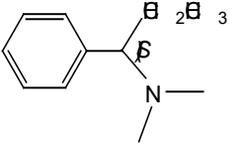
Os polissacarídeos estão entre os biopolímeros naturais com atividade ótica mais importante e abundante, tipicamente celulose, amido (amilose) e dextrano. Têm uma unidade regular de repetição de d-glicose em todos os polímeros de acordo com Okamoto et al. (1988).

As fases quirais baseadas em polissacarídeos com utilização de um suporte, como a sílica, são as mais utilizadas para a separação de enantiômeros por cromatografia, pois, apresentam estabilidade mecânica e boa eficiência para a separação com cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) segundo Yashima (2001).

Devido à diferença entre as configurações dos resíduos de glicose, a amilose e a celulose apresentam estruturas tridimensionais e propriedades físicas muito diferentes entre si. Os polissacarídeos naturais apresentam propriedades mecânicas fracas e limitada capacidade de resolução quiral. Entretanto, a derivação desses polissacarídeos em acetatos, benzoatos, triésteres e fenilcarbamatos conduz à formação de novos sítios de reconhecimento quiral para a separação dos enantiômeros de uma variedade de compostos racêmicos, melhorando assim, as propriedades cromatográficas e enantiosseletivas como indicado por Jardim et al. (2006).

Algumas FEQs baseadas em derivados de amilose e celulose estão apresentadas nas Tabelas 1.4 e 1.5

**Tabela 1.4.** Estrutura química de FEQs baseadas em derivados de amilose e celulose.

Estrutura química	R	Seletor quiral
<p data-bbox="120 695 213 720">Celulose</p> 	<p data-bbox="393 452 437 477">CH<sub>3</sub></p>	<p data-bbox="647 452 874 477">Triacetato de celulose</p>
		<p data-bbox="647 533 897 558">Tribenzoato de celulose</p>
	<p data-bbox="393 650 437 675">H<sub>3</sub>C</p> 	<p data-bbox="647 634 911 692">Tris(4-metilbenzoato) de celulose</p>
	<p data-bbox="393 816 437 840">H<sub>3</sub>C</p> 	<p data-bbox="647 751 973 809">Tris(4-metilfenilcarbamato) de celulose</p>
	<p data-bbox="393 852 437 877">H<sub>3</sub>C</p>  <p data-bbox="415 996 460 1020">H<sub>3</sub>C</p>	<p data-bbox="647 910 981 968">Tris(3,5-dimetilfenilcarbamato) de celulose</p>
<p data-bbox="120 1276 210 1301">Amilose</p> 	<p data-bbox="393 1172 437 1197">H<sub>3</sub>C</p>  <p data-bbox="415 1293 460 1318">H<sub>3</sub>C</p>	<p data-bbox="647 1222 981 1280">Tris(3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose</p>
		<p data-bbox="647 1389 936 1447">Tris[(S)-fenilcarbamato] de amilose</p>

Fonte: Francotte (2005).

Essas fases estacionárias apresentadas nas Tabelas 1.4 e 1.5 são referentes a polissacarídeos imobilizadas em sílica por meio de adsorção física, contudo é válido lembrar que esses polissacarídeos são solúveis em muitos solventes orgânicos como tetrahydrofurano, tolueno, acetato de etila, entre outros. Esta propriedade restringe consideravelmente a escolha da fase móvel a solventes compatíveis, nos quais os derivados não são solúveis, de acordo com Francotte (2005).

**Tabela 1.5.** Principais FEQs baseadas em derivados de amilose e celulose suportada em sílica disponível comercialmente.

Polissacarídeo	Derivado	Nome comercial	
Celulose	Benzoato	Chiralcel OB	
		Chiralcel OB-H	
		Chiralcel OD	
	3,5-Dimetilfenil carbamato	Chiralcel OD-H	
		Chiralcel OD-R	
		Chiralcel OD-RH	
	4-Metilbenzoato	Chiralcel OJ	
		Chiralcel OJ-H	
		Chiralcel OJ-RH	
		4-Metilfenil carbamato	Chiralcel OG
		4-clorofenil carbamato	Chiralcel OF
		Cinimato	Chiralcel OK
	Fenil carbamato	Chiralcel OC	
	Amilose	3,5-Dimetilfenil carbamato	Chiralpak IA-H
Chiralpak AD			
Chiralpak AD-H			
Chiralpak AD-RH			
(S)- $\alpha$ -metilbenzil carbamato		Chiralpak AS	
		Chiralpak AS-H	
		Chiralpak AS-RH	

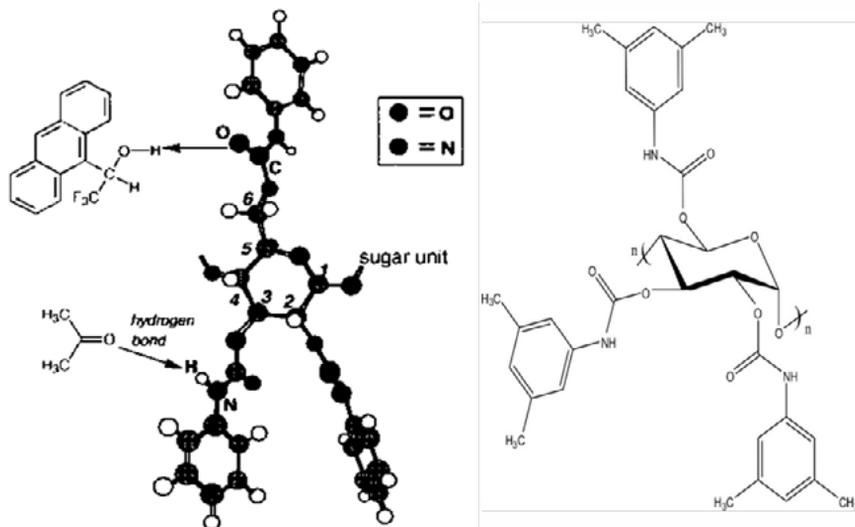
Fonte: Francotte(2005)

O mecanismo de reconhecimento quiral tem sido extensivamente investigado e refere-se à capacidade da fase estacionária quiral em interagir de maneira diferente e preferencial com os dois enantiômeros, conduzindo à sua separação (Jardim et al., 2006).

As capacidades dos fenilcarbamatos de polissacarídeos para reconhecer a quiralidade são fortemente afetadas pelos substituintes nos grupos fenil. A adsorção quiral é provavelmente nos grupos carbamato polar, que são capazes de interagir com um racemato através de ligações de hidrogênio aos grupos N-H e C=O que estão representados na Figura 1.8.

Derivados de amilose apresentam cavidades helicoidais formadas entre as unidades de D-glicose com os grupos carbamato localizados no interior e os grupos aromáticos hidrofóbicos localizados mais externamente. A resolução quiral está vinculada ao ajuste dos enantiômeros nas cavidades do polissacarídeo e às interações com os grupos carbamato de acordo com Yashima et al. (2001).

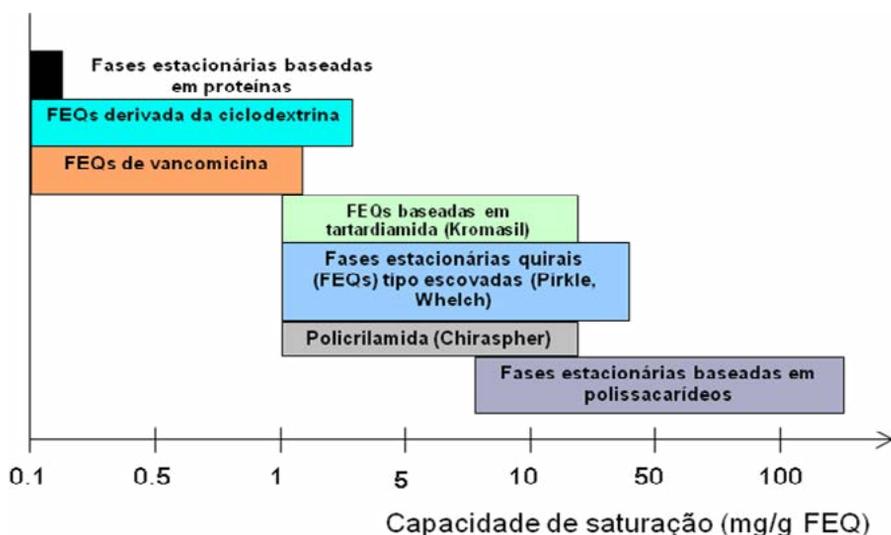
**Figura 1.8.** a) Possíveis locais de interação de derivados de tris (fenilcarbamatos) de celulose; b) Estrutura do Tris 3,5-(dimetilfenilcarbamato) de amilose.



É importante destacar que, após revisar cerca de 1.000 separações de misturas racêmicas, o Dr. Eric Francotte reportou no evento *Chiral Europe 2004 Meeting* que 90% das misturas racêmicas poderiam ser separadas por quatro fases estacionárias derivadas dos polissacarídeos celulose e amilose, e que se destacam por sua alta capacidade de saturação (Figura 1.9).

Os polissacarídeos precisam estar ancorados em um suporte sólido para melhorar a eficiência e seletividade das colunas quirais utilizadas na Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). Verifica-se na literatura que esses polissacarídeos normalmente são suportados em sílica. A sílica já está consolidada como um suporte universal, entretanto, novos materiais que servem como suportes tem ganhado visibilidade, devido a maior área superficial e a porosidade, além de alta estabilidade química e mecânica em relação à sílica de acordo com os trabalhos de Ramiseti et al. (2017) e Ghanem et al. (2018).

**Figura 1.9** - Diagrama sobre tipos de fases estacionárias quirais e suas faixas de saturação. Fonte: Adaptada de Francotte, 2001.



## 1.4.2 Cromatografia para Separação de Enantiômeros

A indústria farmacêutica tem mostrado um número elevado de aplicações de separações cromatográficas quirais. A utilização de fases estacionárias quirais (FEQ) como ferramenta analítica para a determinação da composição de misturas enantioméricas, em estudos biológicos e farmacocinéticos, é atualmente uma técnica bem estabelecida, como reportado por Francotte (1994). No entanto, a aplicação do método na escala preparativa para a produção de materiais opticamente ativos, em quantidades suficientes para testes biológicos, estudos toxicológicos e posteriormente, testes clínicos, está ganhando ampla aceitação. Com isso, o método cromatográfico oferece a vantagem de fornecer ambos enantiômeros requeridos para os testes comparativos, além de ser também largamente aplicado para drogas que não são facilmente acessíveis por uma rota sintética.

Segundo Francotte (1994), pelo menos durante a fase de testes preliminares de novas drogas quirais, a técnica de cromatografia permite acesso rápido aos enantiômeros puros e podem vantajosamente substituir a elaboração frequentemente prolongada de uma síntese enantioseletiva. Uma grande variedade de drogas racêmicas já tem sido separada em FEQs, cobrindo diferentes classes terapêuticas de compostos, tais como: analgésicos, tranquilizantes, diuréticos, anticonvulsivos e antineoplásicos.

Em conformidade com as pesquisas analíticas, surgiu a necessidade de obtenção dos enantiômeros em sua forma enriquecida em quantidades preparativas e, para isso, vários estudos mostraram alternativas para tal propósito. Guiochon (2002) revisou o estado da arte e os principais métodos para implementação da cromatografia líquida preparativa. Em seus estudos, verificaram que a cromatografia está se tornando um método de separação e purificação muito bem estabelecido, principalmente na indústria farmacêutica. Frequentemente surgem novas fases estacionárias quirais que contribuem para a expansão do método.

Estes são apenas alguns trabalhos relatados na literatura que vieram a aprofundar as potencialidades os métodos cromatográficos no fenômeno quiral. Diversificações deste método foram surgindo ao longo do tempo, a fim de suprir adversidades porventura encontradas na separação cromatográfica, como: alta queda de pressão e baixa solubilidade de solutos em solventes líquidos.

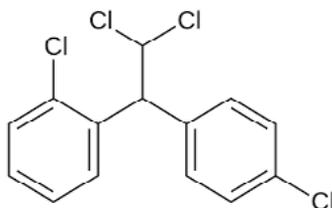
## 1.5 SEPARAÇÃO DE ENANTIÔMEROS DO MITOTANO

Com a utilização colunas de leito fixo empacotadas com fases estacionárias (sólidos que conseguem discriminar moléculas quirais) é possível efetuar separações em pequena escala (da ordem de mg) de diversos enantiômeros. Apresentaremos, a seguir, um resultado importante na separação da mistura racêmica do *o,p'*-diclorodifenildicloroetano (mitotano) que é um a molécula quiral utilizada como neoplásico no tratamento do câncer adrenocortical (Terzolo et al. 2000). Essa separação foi realizada em 2010 no laboratório de Cromatografia Preparativa da Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP (Silva, 2010).

### 1.5.1 Mitotano

O mitotano (*o,p'*-diclorodifenildicloroetano ou *o,p'*-DDD) representa um fármaco da categoria dos antineoplásicos e sua estrutura molecular está apresentada na Figura 1.10.

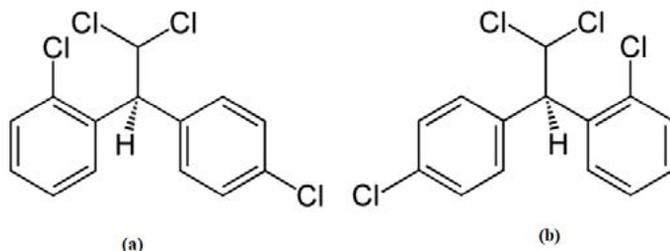
**Figura 1.10.** Estrutura molecular do mitotano



O mitotano é fornecido na forma de comprimidos de 500 mg, e a dose diária administrada deve ser tal que mantenha um nível plasmático de 14-20  $\mu\text{g/mL}$ . O medicamento contendo tal princípio ativo tem nome comercial de Lysodren<sup>®</sup> e é produzido pela *Bristol-Myers-Squibb* (EUA).

A estrutura da molécula de mitotano apresenta um carbono quiral e por isso, existem duas formas enantioméricas (R e S) desta substância, como ilustrado nas partes a e b da Figura 1.11.

**Figura 1.11.** Estrutura molecular espacial dos enantiômeros do mitotano. (a) (S)-mitotano, (b) (R)-mitotano.



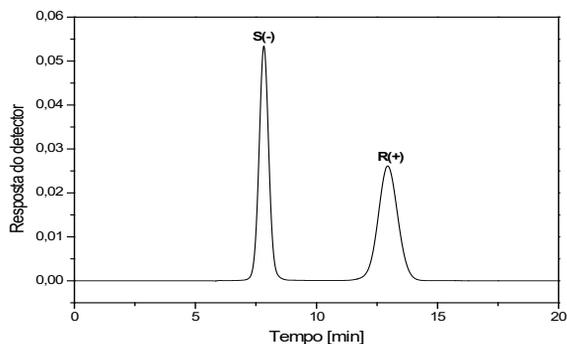
A mistura racêmica do mitotano que utilizada neste trabalho foi fornecida pelo Departamento de Química da Universidade Federal do Paraná (UFPR), que possui interesse imediato no estudo da separação dos enantiômeros pelo fato de um deles (S) ser mais ativo no tratamento da enfermidade.

## 1.5.2 Separação do Mitotano em Coluna Cromatográfica

Utilizando coluna de 10 cm de comprimento e 10 mm de diâmetro empacotada com partículas de 20  $\mu\text{m}$  de diâmetro de Tris 3,5 dimetilfenilcarbamato de amilose cujo nome comercial é Chiralpak AD foi possível efetuar a separação de uma mistura contendo 50 % de cada enantiômero. O perfil cromatográfico da separação em fase diluída é mostrado na Figura 1.12.

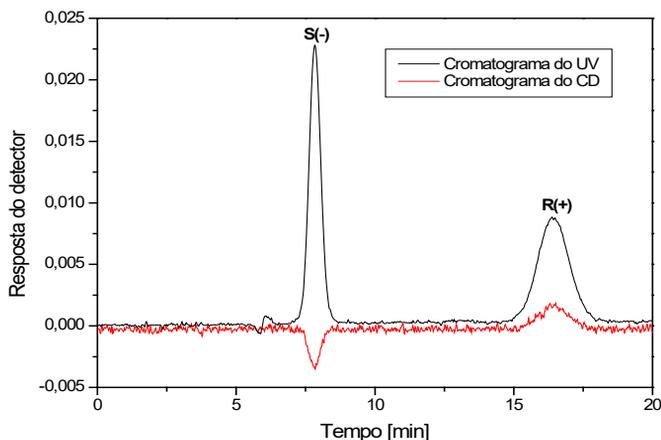
As condições operacionais dessa separação são as seguintes: fase móvel de isopropanol e metanol com composição da fase: 60:40 em volume, respectivamente. A temperatura foi mantida em 25 °C com a concentração da solução de 2,0 g/L e a vazão de eluição de 1 mL/min. O detector utilizado foi de UV.

**Figura 1.12.** Perfil cromatográfico da separação em fase diluída do mitotano em Tris 3,5 dimetilfenilcarbamato de amilose com fase móvel Isopropanol: metanol 60:40 v/v respectivamente.



Com o acoplamento adicional de um detector de dicroísmo circular (CD) é possível identificar também a ordem de eluição dos enantiômeros, como mostrado na Figura 1.13 em experimento realizado com dados obtidos em uma fase móvel isopropanol/metanol numa proporção de 65:35 em volume, respectivamente.

**Figura 1.13.** Cromatograma utilizando detector UV e detector de dicroísmo circular para determinação da ordem de eluição.



Esse exemplo mostra cabalmente a qualidade de separação que se pode obter com mistura diluída em colunas quirais. Os valores quantitativos dos parâmetros cromatográficos para a vazão de 1 ml/min e temperatura de 25°C, são mostrados na Tabela 1.6.

**Tabela 1.6.** Valores dos principais parâmetros cromatográficos para a separação do mitotano.

$k_S$	$k_R$	$\alpha$	$K_S$	$K_R$	$H_S$	$H_R$	$N_S$	$N_R$
0,354	1,254	3,547	0,961	1,590	0,883	5,533	1811	1170

A nomenclatura utilizada para a Tabela 1.6 está resumida na Tabela 1.7.

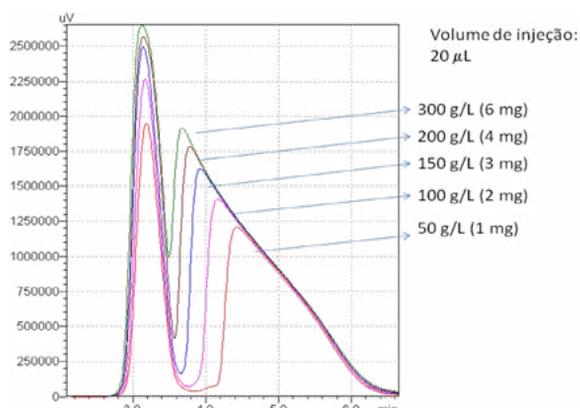
Como veremos nos Capítulos 2 e 3 desse livro para a realização da separação de enantiômeros em escala preparativa (da ordem de gramas e quilogramas por exemplo) são necessárias técnicas que exigem

como dados básicos os cromatogramas para misturas concentradas. No mesmo laboratório da FEQ/Unicamp foram obtidos os dados para a mesma coluna trabalhando com misturas concentradas. Esses dados estão mostrados na Figura 1.14.

**Tabela 1.7.** Parâmetros cromatográficos obtidos a partir de dados experimentais obtidos com soluções diluídas (adsorção linear).

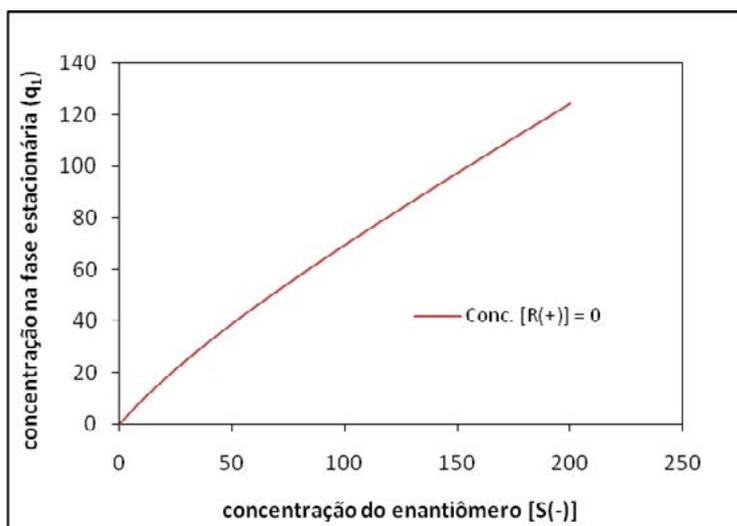
Fator de retenção	$k'_i = \frac{t_{R,i} - t_0}{t_0}$
Seletividade	$\alpha = \frac{k'_{i2}}{k'_{i1}}$
Assimetria	$A_0 = \frac{B}{A}$
Resolução	$R_S = 2 \frac{(t_{R,2} - t_{R,1})}{(W_{b,1} + W_{b,2})}$
Número de pratos	$N_p = 5,54 \left( \frac{t_{R,i}}{W_{b1/2,i}} \right)^2$

**Figura 1.14.** Perfil de eluição em fase concentrada (sobrecarga da coluna).

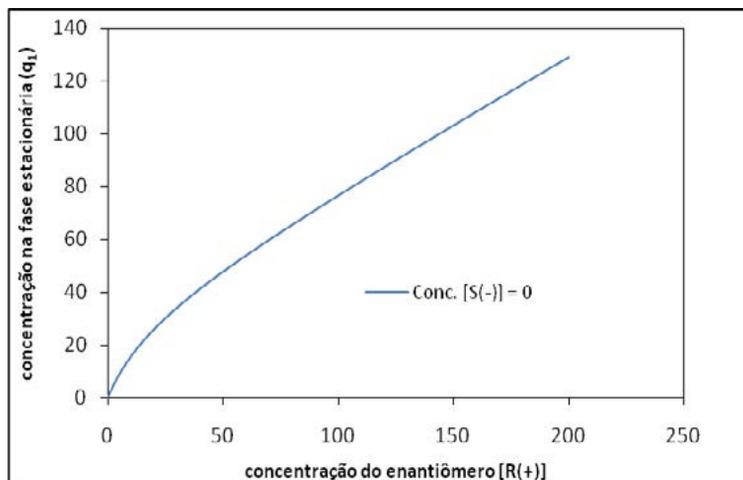


Os dados com misturas a várias concentrações permitem a obtenção das isothermas segundo o tratamento matemático fornecido por Nicoud e Seidel-Morgenstern (1996). As isothermas para os dois enantiômeros do mitotano, que foram calculadas e mostradas nas Figuras 1.15 e 1.16.

**Figura 1.15.** Isotherma de adsorção do enantiômero S(-) na fase estacionária Chiralpak AD a 25 °C.



**Figura 1.16.** Isoterma de adsorção do enantiômero R(+) na fase estacionária Chiralpak AD a 25 °C.



As equações 1.21 e 1.22 resultantes para cálculos com as isotermas foram representadas pelo modelo de Langmuir competitivo:

$$q_S = 0,5C_S + \frac{0,4907C_S}{1+0,0153C_S+0,0492C_R} \quad (1.21)$$

$$q_R = 0,5C_R + \frac{1,574C_R}{1+0,0153C_S+0,0492C_R} \quad (1.22)$$

A partir dos resultados apresentados para a separação da mistura racêmica do o, p'-diclorodifenildicloroetano (mitotano) em uma coluna, verificamos um grande sucesso na separação do mitotano obtido na obtenção dos dados com a fase estacionária 3,5 dimetilfenilcarbamato de amilose e com a utilização da fase móvel isopropanol:metanol na proporção em volume de 60:40, respectivamente.

Os resultados mencionados apresentam excelente qualidade na separação quirál em fase diluída e boa qualidade de separação para soluções mais concentradas da mistura.

Em função da obtenção de um conjunto coerente e completo de resultados para uma coluna, consideramos como promissora a separação contínua por meio de métodos preparativos, que serão delineados nos Capítulos 2 e 3 desse livro.

## 1.6 CONCLUSÕES

Foi realizada inicialmente uma breve revisão de estereoquímica molecular de modo a permitir aos leitores a compreensão dos métodos de separação de moléculas quirais. Procuramos enfatizar que as etapas de separação e purificação são críticas nos processos farmacêuticos especialmente com relação aos custos de separação em relação aos totais do processo. Adsorção e cromatografia são operações controladas pela variável concentração e o aumento no mercado do número e quantidades dos produtos separados têm conduzido à otimização e à perspectiva da implementação em processos contínuos. O desenvolvimento de novos adsorventes mais específicos e a integração dos processos oferece um potencial importante para as melhorias desses processos.



# LEITURA COMPLEMENTAR

O leitor interessado numa revisão dos conceitos básicos sobre o tema aqui proposto, para a correta compreensão dos princípios que fundamentam os procedimentos sugere-se a leitura das seguintes publicações:

Ahuja, S., **Chiral Separations by Chromatography**, Oxford University Press, New York, p. 244, 2000.

Ahuja, S., **Overview of Chiral Separations: Chiral Separation Methods for pharmaceutical and biotechnological products**. New Jersey: John Wiley & Sons, v. 15, p. 946, 2012.

Guiochon, G., Shirazi, S. G., Katti, A. M., **Fundamentals of Preparative and Nonlinear Chromatography**, Academic Press, London, p. 701, 1994.

Cox, G. B., Ed., **Preparative Enantioselective Chromatography**. 1st ed. Oxford Blackwell Publishing, p. 330, 2005.

# AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à FAPESP, ao CNPq e à CAPES pelo suporte financeiro na forma de projetos e bolsas de pesquisa.

## REFERÊNCIAS

Arnold, F. H., Blanch, H. W., Wilke, C. R., Liquid chromatography plate height equations. **Journal of Chromatography**. 330: 159-166, 1985a.

Arnold, F.H, Blanch, H.W., Wilke, C.R. **Analysis of affinity separations: II: The characterization affinity columns by pulse techniques**. Chemical Engineering Journal. 30: B25 – B36, 1985b.

Bonato, P. S., Jabor, V. A. P., Gaitani, C. M. **Análise enantioselectiva de fármacos: contribuições da cromatografia líquida de alta eficiência e eletroforese capilar**. Química Nova. 28: 683-691, 2005.

Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC nº 73 de 7 de abril de 2016, dispõe sobre mudanças pós-registro, cancelamento de registro de medicamentos com princípios ativos sintéticos e semissintéticos e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 2016.

Cass Q. B.; Degani, A. L. G. **Desenvolvimento de métodos por HPLC: fundamentos, estratégias e validação**. São Paulo: Universidade Federal de São Carlos, 2001.

Francotte, E. Contribution of preparative chromatography resolution to the investigation of chiral phenomena. **Journal of Chromatograph A**. 666: 565-601, 1994.

Francotte, E. R. **Chiral stationary phases for preparative enantioselective chromatography**. Preparative Enantioselective Chromatography. Chap., v. 3, p. 48-77, 2005.

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

Ghanem, A., Wang, C. Enantioselective separation of racemates using Chiralpak IG amylose-based chiral stationary phase under normal standard, non-standard and reversed phase high performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**. 1532: 89–97, 2018.

Guiochon, G. Shirazi, S.G., Katti, A.M. **Fundamentals of preparative and nonlinear chromatography**, Academic Press, London, p. 701, 1994.

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

Jardim, I.C.S.F., Collins, C.H., Guimarães, L.F.L. **Cromatografia líquida de alta eficiência**. in: fundamentos de cromatografia. Editora da UNICAMP. Campinas, p. 273-398, 2006.

Kauffman, G.B., Myers, R.D. The resolution of racemic acid: A classical stereochemical experiment for undergraduate laboratory. **Journal of Chemical Education**. 52: 777-781, 1975.

Mihlbachler, K. Kaczmarek, K. Seidel-Morgenstern, A. Guiochon, G. Measurement and modeling of the equilibrium behavior of the Troger's base enantiomers on an amylose-based chiral stationary phase. **Journal of Chromatography A**. 955: 35-52, 2002.

Miyabe, K., Suzuki, M. **Chromatography of liquid-phase adsorption on octadecylsilyl-silica gel**. *AIChE Journal*. 38: 901-909, 1992.

Nicoud, R. M., Seidel-Morgenstern, A. **Adsorption Isotherms: Experimental Determination and Application to Preparative Chromatography**. *Isolation and Purification*. 2: 165-200, 1996.

Okamoto Y., Aburatani R., Fukumoto T., Hatada K. **Direct optical resolution of carboxylic acids by chiral hplc on tris(3,5-dimethylphenyl)carbamate) of cellulose and amylose**. *Chemistry Letters*. 17: 1125-1128, 1988.

Ramisetti, N., Arnipalli, M., Nimmu, N.; Bondigalla, R. UHPLC **Determination of besifoxacin enantiomers on immobilized amylose tris(3,5dichlorophenylcarbamate) chiral stationary phase.** *Chromatographia*. 80: 1509-1515, 2017.

Ruthven, D. **Principles of Adsorption and Adsorption Processes.** John Wiley & Sons, New York, 1984.

Seidel-Morgenstern, A. Experimental determination of single solute and competitive adsorption isotherms. **Journal of Chromatography A**. 1037: 255-272, 2004.

Sewell, P. A., Clarke, B., Kealey, D. **Chromatographic separations.** London: John Wiley & Sons, United Kingdom, 356 p, 1988.

Silva, J.A.C. Separação cromatográfica do O,P'-diclorodifenildicloroetano (mitotano) em fase estacionária quiral tris-3-cloro-4- metilfenilcarbamato de celulose e tris-3,5 dimetilfenilcarbamato de amilose, **Tese de Doutorado**, Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP. 2010.

Terzolo, M., Pia, A., Berruti, A., Osella, G., Ali, A., Carbone, V., Testa, E., Dogliotti, L., Angeli, A. Low-dose monitored mitotane treatment achieves the therapeutic range with manageable side effects in patients with adrenocortical cancer. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**. 85: 2234-2238, 2000.

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

Zeid, R. L. **Regulatory and Development Considerations of Chiral Compounds.** In: Ahuja, S. (Ed.). *Chiral Separation Methods for pharmaceutical and biotechnological products.* New Jersey: John Wiley & Sons, p. 9-34, 2011.

# 2

## Separação cromatográfica preparativa em sistemas cromatográficos contínuos de leito móvel simulado

Cesar Costapinto Santana<sup>1,2</sup>

Ivanildo José Silva Jr.<sup>3</sup>

Amaro Gomes Barreto Jr.<sup>4</sup>

1 Universidade Tiradentes –

Av. Murilo Dantas 300, Farolândia. Aracaju Sergipe, Brasil. 49032-490.

2 Universidade Estadual de Campinas –

Cidade Universitária Zeferino Vaz, Barão Geraldo. Campinas-São Paulo, Brasil. 13083-872.

3 Universidade Federal do Ceará, Fortaleza – CE, Brasil CEP 60455 -760.

4 Universidade Federal do Rio de Janeiro – Rio de Janeiro - RJ, Brasil. CEP 21941-596.



# RESUMO

Existem no campo de desenvolvimento de processos de separação e purificação em escala semi-preparativa e preparativa diversos exemplos de aplicação com sucesso do uso de coluna cromatográfica de maiores diâmetros operando com vazões mais elevadas. Por outro lado, esses sistemas descontínuos e operando em semi-batelada apresentam algumas limitações principalmente pelo alto consumo de solvente e produtividades relativamente baixas por massa de adsorvente quando comparados com sistemas que operam continuamente e em contracorrente. Esse fato é observado também em todas as outras operações de transferência de massa que são governadas pela variável concentração. O conceito básico da tecnologia de Leito Móvel Simulado (LMS), que opera continuamente e em contracorrente foi desenvolvida nos anos iniciais da década de 1960 pela empresa *Universal Oil Products* para separações em grande escala nas indústrias petroquímica e açucareira. Novos campos de atuação são a química fina, a biotecnologia e a separação de moléculas quirais. Apresentamos nesse capítulo os fundamentos dessa técnica, que é considerada uma importante inovação em processos de separação. São também desenvolvidos os conceitos do projeto das condições operacionais e efetuado um estudo de caso de separação com o conceito LMS do anestésico cetamina com o completo desenvolvimento do método de separação para demonstrar a potencialidade e as vantagens dessa tecnologia de separação e purificação.

## 2.1 INTRODUÇÃO

### 2.1.1 O Leito Móvel Verdadeiro (LMV)

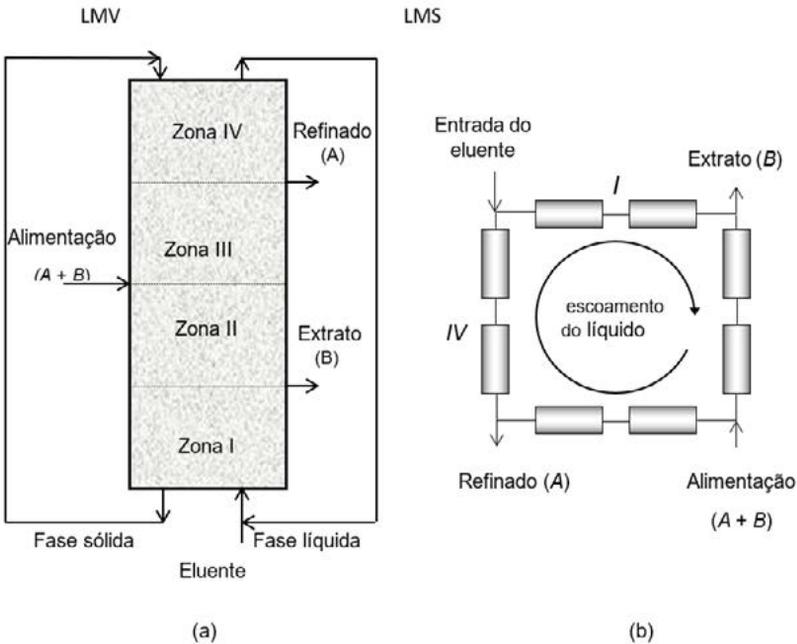
Um fato bem conhecido nas operações de adsorção é que sistemas que operam continuamente e cuja fase sólida entra em contato na direção oposta à fase fluida, apresentam um perfil que permanece estacionário e que desse modo o adsorvente é utilizado de maneira mais eficiente (Guiochon et al.,1994).

O processo denominado Leito Móvel Verdadeiro (LMV) permite uma operação contínua, distinta do processo clássico de cromatografia com eluição. Em um LMV (Figura 2.1a), as fases fluida e sólida movimentam-se em direções opostas. As portas de entradas (alimentação e eluente) e saídas (extrato e refinado) são fixadas ao longo do sistema. De acordo com a posição das correntes de entrada e saída, quatro diferentes seções de operação podem ser observadas. Seção I localizada entre as correntes do eluente e do extrato; seção II localizada entre as correntes de extrato e alimentação; seção III localizada entre as correntes de alimentação e refinado; e, seção IV localizada entre as correntes de refinado e eluente. As vazões necessitam ser selecionadas em cada seção de modo a garantir a regeneração do adsorvente na seção I, a eluição do componente menos fortemente adsorvido na seção II, a adsorção do mais fortemente adsorvido na seção III e a regeneração do eluente na seção IV.

A necessidade da recirculação no processo não apenas do fluido, mas também do sólido no LMV, acarreta uma série de desvantagens como uma vida curta do adsorvente devido ao atrito, velocidades do fluido limitada pelo fenômeno da fluidização e perda de eficiência do processo. Desse modo, esforços foram colocados para desenvolver processos que mantêm as vantagens da operação evitando a circulação dos sólidos. A primeira solução para resolver esse problema foi apresentada por Broughton e Gerhold (1961) com a proposta de usar colunas de leitos fixos simulando o movimento do sólido por uma

mudança sincronizada de todas as portas de entrada e saída na direção do escoamento do fluido (Figura 2.1b).

**Figura 2.1.** Esquema simplificado do LMV (à esquerda) e LMS (à direita) com oito colunas. O componente A adsorve menos fortemente que o componente B.



Foi demonstrado, experimentalmente, por Mallmann et al. (1998) que essas condições garantem o sucesso da separação com o componente mais retido se movendo para a porta do extrato juntamente com a fase sólida enquanto o componente menos retido se move para a porta do refinado com a fase líquida.

As idéias que conduzem à simulação do movimento do sólido conduziram ao conceito do Leito Móvel Simulado (LMS), o qual é uma alternativa ao observado em um sistema contra-corrente atuando no movimento do adsorvente periódico das portas de entrada e saída em um anel constituído de leitos fixos.

## 2.1.2 O Leito Móvel Simulado (LMS)

Na Figura 2.1, os dois diferentes processos de adsorção são apresentados no modo de operação contracorrente. Na maior parte das inovações encontradas no processo LMS o movimento dos sólidos é obtido por mudanças periódicas na alimentação e na descarga em um sistema de colunas múltiplas.

O leito móvel simulado vem sendo aplicado desde 1960 pela empresa *Universal Oil Products* (UOP) para separações em larga escala na indústria petroquímica. Atualmente outras aplicações do LMS em escala preparativa estão ganhando enorme importância na separação de açúcares, em química fina, e fármacos especialmente no campo dos enantiômeros. Exemplos destacados são a separação de glicose e frutose (Azevedo e Rodrigues, 2001) e a separação de enantiômeros usando fases estacionárias quirais (Zenoni et al., 2000, Santos et al., 2004, Veredas et al., 2006). Desafios em separação e purificação de biomoléculas são reportados por Li (2007) com os casos de proteínas terapêuticas e anticorpos.

O LMS apresenta vantagens econômicas sobre outros processos por diversas razões, sendo as principais o caráter de processo contínuo que efetua a separação de produtos similares (começando como exemplo com uma mistura racêmica permitindo alta produção) e baixo consumo de solvente. Em geral, no LMS o consumo de fase estacionária é aproximadamente 25% mais baixo do que as necessidades de um processo em batelada.

Um considerável número de artigos e capítulos de livros de revisão de sistemas operando com leitos móveis simulados ocorre na literatura onde destacamos os trabalhos de Nicoud (2000) e Santana et al. (2005), que são consideradas aqui como representativas dos estudos em LMS.

A Figura 2.1 mostra que o LMS usa um conjunto de colunas de adsorção em série contendo, em geral de oito a vinte e quatro colunas, além de um adsorvente apropriado. As colunas são conectadas a recipientes que contêm a alimentação e o eluente e que recebem as correntes de

saída dos produtos por meio de tubos cujas vazões são controladas por um grupo de válvulas de posições múltiplas. Esse grupo de válvulas tem a possibilidade de permitir alternar pontos de entrada da alimentação, eluente e correntes de saída em intervalos regulares de tempo. O sistema troca as posições entre os pontos de entrada e saída, simulando assim o escoamento contracorrente. Essas condições garantem o sucesso da separação, cujo componente mais retido se move para a porta do extrato e o componente menos retido se move para a porta do refinado com a fase líquida.

As unidades LMS exibem importantes vantagens em relação a operações cromatográficas preparativas em batelada. A natureza contínua do LMS conduz a um uso mais eficiente das fases estacionária e móvel, o que permite a diminuição das necessidades da fase móvel e ao aumento da produtividade por unidade de tempo e de massa da fase estacionária. Além dessas vantagens, verifica-se que altos desempenhos podem ser obtidos mesmo a baixos valores de seletividade e com um número mais reduzido de pratos teóricos. Desse modo, ao contrário das operações em batelada, os perfis de concentrações dos componentes a serem separados se superpõem ao longo dos leitos sólidos e as retiradas dos componentes podem ser feitas em forma quase pura nas localizações do extrato e do refinado. Devido a essas características positivas, o LMS é particularmente atrativo para separação de enantiômeros, para a qual as técnicas convencionais falham devido às baixas seletividades desses compostos.

Para estudos experimentais com LMS foi montado no Laboratório de Cromatografia Preparativa da Faculdade de Engenharia Química da UNICAMP um sistema com oito colunas que é apresentado na Figura 2.2. A configuração da unidade em escala de laboratório contém oito colunas (20 x 0,77 cm I.D.) distribuídas em quatro zonas (duas colunas por zona). O eluente é reciclado fora da série de colunas usando uma válvula de multiposição em lugar de uma bomba de reciclo. Outras quatro válvulas de multiposição são responsáveis pelas mudanças de posição da alimentação, da entrada do eluente, e do extrato e do refinado em tempos de troca pré-determinados. Essas válvulas estão conectadas a bombas cromatográficas semi-preparativa com vazões máximas de 20

mL/min. As válvulas são comandadas e ligadas a um computador por um sistema de aquisição de dados. Cada válvula opera automaticamente com as vazões pré-selecionadas por um programa de computador escrito em *Labview*. A unidade possui também válvula de amostragem, permitindo a coleta de amostras. A análise dessas amostras por HPLC permite a determinação dos perfis internos de concentração de cada enantiômero, o que ilustra adequadamente a dinâmica da separação dentro da série de colunas.

**Figura 2.2.** Unidade de leito móvel simulado (LMS) montada no Laboratório de Cromatografia Preparativa da Faculdade de Engenharia Química da Unicamp



Do ponto de vista das variáveis operacionais, o projeto do LMS é relativamente complexo devido ao envolvimento de pelo menos 10 parâmetros específicos, a saber: diâmetro das colunas, quatro comprimentos de zonas de separação, quatro vazões e uma velocidade média associada ao controle da abertura das válvulas de múltiplas posições. O LMS é frequentemente usado para a separação de misturas de dois componentes similares e de valor agregado elevado, embora já existam também aplicações para multicomponentes.

## 2.2 PROJETO DAS CONDIÇÕES OPERACIONAIS

### 2.2.1 Aspectos Gerais

Para encontrar as condições operacionais mais efetivas são utilizados métodos específicos de cálculo como descrito por Santana et al. (2009). Essa tarefa exige a escolha de variáveis de decisões de modo a atingir as variáveis de desempenho desejáveis. Descrições matemáticas de diferentes complexidades são usadas para representar os mecanismos dominantes do processo e a estimativa dos parâmetros físico-químicos da separação são etapas fundamentais a serem atingidas antes da otimização do processo. Apresentaremos aqui métodos simplificados que se baseiam na termodinâmica do equilíbrio na adsorção. Outros métodos que incluem os efeitos de transferência de massa são bem descritos por Rodrigues et al. (2015) em recente contribuição ao tema.

### 2.2.2 Enfoque Baseado no Equilíbrio do LMV

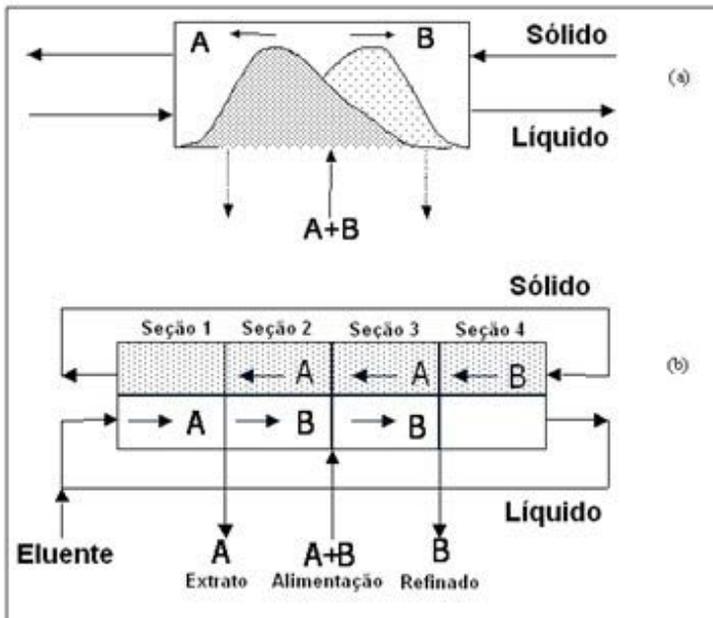
Os enfoques baseados no LMV apresentam uma analogia com o LMS operando em regime estacionário. Nesse caso as variáveis de decisão são definidas inicialmente pelas vazões do líquido e do sólido em cada seção. Todas as outras variáveis ficam assim especificadas, e assim ocorre uma diminuição do número de equações que descrevem o

comportamento da unidade. Essa analogia é usada para a identificação das condições necessárias para o movimento das duas fases para atingir a separação completa das substâncias de interesse.

Para uma mistura  $A+B$  a ser separada em um LMV certas condições de escoamento, para cada espécie, devem ser válidas. Por exemplo, observando-se a Figura 2.3, nas seções 2 e 3 o componente mais retido (A) mover-se-á na direção da fase sólida enquanto o menos retido (B) mover-se-á na direção da fase líquida. Além disso, na seção 1 o componente mais retido move-se na mesma direção da fase líquida e na seção 4 o componente menos retido move-se na mesma direção do sólido.

Do ponto de vista matemático, se A é a espécie mais retida e B a menos retida, as restrições de escoamento podem ser estabelecidas como se segue:

**Figura 2.3.** Separação cromatográfica de uma mistura de dois componentes A e B em um leito móvel verdadeiro (LMV).



Do ponto de vista matemático, se A é a espécie mais retida e B a menos retida, as restrições de escoamento podem ser estabelecidas como se segue:

$$\frac{Q'_1 \times C_{A,1}}{Q'_s \times q_{A,1}} > 1 \quad (2.1)$$

$$\frac{Q'_2 \times C_{A,2}}{Q'_s \times q_{A,2}} < 1 \text{ e } \frac{Q'_2 \times C_{B,2}}{Q'_s \times q_{B,2}} > 1 \quad (2.2)$$

$$\frac{Q'_4 \times C_{B,4}}{Q'_s \times q_{B,4}} < 1 \quad (2.3)$$

onde:  $Q'_2 < Q'_3$  e que C e q são concentrações na fase líquida e na fase sólida respectivamente.  $Q'_j$  e  $Q'_s$  representam as vazões volumétricas do fluido na seção j e a vazão de sólidos em um LMV, respectivamente.

### 2.2.3 Equilíbrio com Isotherma Linear: Enfoque do Triângulo

O caso mais simples de formulação matemática para sistemas contínuos considera isotermas de adsorção lineares e não acopladas. A análise da representação equivalente ao leito móvel verdadeiro para esse modelo de equilíbrio conduz a inequações explícitas para as relações entre as vazões de sólido e líquido nas quatro seções do LMV que estão representadas nas Equações (2.1), (2.2) e (2.3). Desse modo para sistemas lineares o LMV é um processo controlado pela vazão exclusivamente, o que significa dizer que o projeto do LMV ou do LMS equivalente não depende da concentração da alimentação dentro da interpretação da teoria do equilíbrio.

Definindo-se os parâmetros  $m_j$  como as razões entre volumes de líquido e de sólido em cada seção  $j$  da unidade LMS (Equação 2.4):

$$m_j = \frac{Q_j^{LMS} t^* - V \varepsilon^*}{V(1 - \varepsilon^*)} \quad (2.4)$$

onde  $Q_j^{LMS}$  é a vazão volumétrica de líquido na seção  $j$  da unidade LMS e  $t^*$  é o tempo de troca das posições das correntes e  $V$  é o volume da coluna.

Temos que para a isoterma descrita pela equação (2.5):

$$q_i^* = K'_i C_i, \quad i = A, B \quad (2.5)$$

Teremos os parâmetros  $m$  em cada seção expressos por:

$$K'_A < m_1 < \infty \quad (2.6)$$

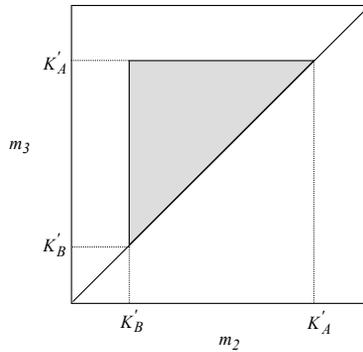
$$K'_B < m_2 < m_3 < K'_A \quad (2.7)$$

$$0 < m_4 < K'_B \quad (2.8)$$

Os coeficientes  $K'$ s da Equação (2.5) são obtidos experimentalmente. Os  $m$ s estão definidos na Equação (2.4).

A Figura 2.4. resume um diagrama para a representação de  $m_2$  e  $m_3$ .

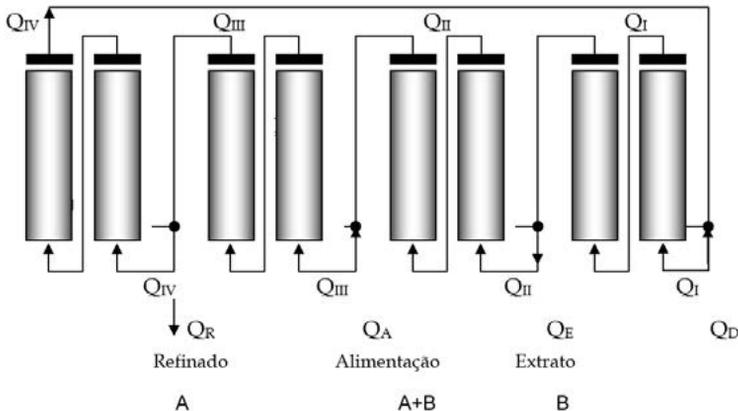
**Figura 2.4.** Condições operacionais para a separação completa (região em cinza) sendo válida a teoria do equilíbrio com isothermas lineares.



## 2.2.4 Enfoque baseado no Equilíbrio para LMS

Para uma melhor compreensão sobre os métodos de cálculo simplificados para as vazões em cada zona do LMS apresentamos na Figura 2.5 um esquema que apresenta os nós de entrada e saída das quatro vazões.

**Figura 2.5.** Representação das vazões e nós de entrada e saída em um LMS.



As equações do balanço de massa e fluxo em cada nó (Figura 4) são dadas pelas Equações (2.9) e (2.10), nas quais  $Q_I$ ,  $Q_{II}$ ,  $Q_{III}$  e  $Q_{IV}$  são as vazões volumétricas nas correspondentes zonas do LMS,  $Q_A$  é a vazão de alimentação,  $Q_D$  é a vazão de dessorvente,  $Q_E$  é a vazão do extrato e  $Q_R$  é a vazão de refinado. Assume-se que não há dispersão nesses nós.

Nó de entrada da alimentação:

$$Q_{II} + Q_A = Q_{III} \quad (2.9)$$

$$C_{i,II}^{sai} Q_{II} + C_{i,A} Q_A = C_{i,III}^{ent} Q_{III} \quad (2.10)$$

Nó de entrada do dessorvente:

$$Q_{IV} + Q_D = Q_I \quad (2.11)$$

$$C_{i,IV}^{sai} Q_{IV} + C_{i,D} Q_D = C_{i,I}^{ent} Q_I \quad (2.12)$$

Nó de saída do extrato:

$$Q_I - Q_E = Q_{II} \quad (2.13)$$

$$C_{i,I}^{sai} = C_{i,II}^{ent} = C_{i,E} \quad (2.14)$$

Nó de saída do refinado:

$$Q_{III} - Q_R = Q_{IV} \quad (2.15)$$

$$C_{i,III}^{sai} = C_{i,IV}^{ent} = C_{i,R} \quad (2.16)$$

onde:  $C_{i,j}^{sai}$  e  $C_{i,j}^{ent}$  são as concentrações do componente  $i$  na saída e entrada da coluna  $j$ , respectivamente,  $Q_j$  é a vazão volumétrica através da coluna  $j$  e cuja relação com a velocidade da fase líquida é dada por  $Q_j = \Delta A u_j$ , em que  $A$  é a área da seção transversal da coluna.

Para que se possa operar a unidade LMS é necessário, antes de tudo, saber se a mistura racêmica em questão pode ser separada no adsorvente adquirido, ou seja, se este último reconhece as diferenças entre os dois enantiômeros. Essa informação pode ser obtida, a princípio, a partir da medição das isotermas lineares, válidas para sistemas diluídos, com concentrações menores que 2 g/L. É a partir dos dados das isotermas que se projetam as condições operacionais da unidade LMS que podem levar à separação dos enantiômeros, a saber, as vazões nas quatro bombas e o tempo de troca de posição das correntes. A relação entre as isotermas lineares e as condições operacionais da unidade necessárias à separação dos enantiômeros pode ser resumida nas restrições dadas pelas Equações 2.17 a 2.19:

$$m_1 > K_R \quad (2.17)$$

$$K_S < m_2 < m_3 < K_R \quad (2.18)$$

$$M_4 < K_S \quad (2.19)$$

onde:  $K_R$  e  $K_S$  são as constantes de Henry dos enantiômeros, enquanto os parâmetros  $m_j$  são as razões entre volumes de líquido e de sólido em cada seção  $j$  da unidade LMS.

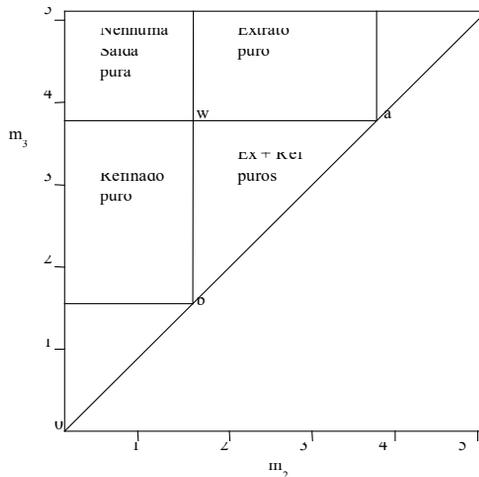
As constantes de Henry são medidas por meio da injeção do racêmico em um sistema HPLC contendo uma das colunas da unidade. A partir dos tempos de retenção de cada um dos enantiômeros, as constantes de Henry são calculadas pela Equação (2.20).

$$K_i = \frac{(t_i^R - t_0)}{t_0} \frac{\varepsilon^*}{1 - \varepsilon^*} \quad (2.20)$$

onde: a variável  $t_i^R$  significa o tempo de retenção do enantiômero  $i$  na coluna,  $t_0$  é o tempo de retenção do inerte e  $\varepsilon^*$  é a porosidade do sólido.

As restrições impostas pelas equações apresentadas levam à construção de um gráfico indicado na Figura 2.6 determinado pelas constantes de Henry, que define a região de completa separação no plano das coordenadas  $m_2$  e  $m_3$ . A escolha de um ponto ( $m_2, m_3$ ) nessa região leva à definição de um conjunto de condições operacionais (vazões nas bombas e tempo de troca  $t^*$ ) adequado para a separação dos enantiômeros que estão representadas na Figura 2.5.

**Figura 2.6.** Região de completa separação na unidade LMS para sistemas diluídos. Definir  $m_3$  e  $m_2$



A predição de separação de misturas racêmicas na unidade de separação contínua de leito móvel simulado (LMS) pode ser avaliada pelos parâmetros de desempenho definidos abaixo na Tabela 2.1.

**Tabela 2.1.** Definição dos parâmetros de desempenho do processo cromatográfico contínuo

Parâmetros	Extrato	Refinado
Excesso enantiomérico (%)	$ee(\%) = \frac{C_B^E - C_A^E}{C_A^E + C_B^E} \times 100$	$ee(\%) = \frac{C_A^R - C_B^R}{C_A^R + C_B^R} \times 100$
Pureza (%)	$P_E = \frac{100C_B^E}{C_A^E + C_B^E}$	$P_R = \frac{100C_B^R}{C_A^R + C_B^R}$
Consumo de solvente (L/kg)	$CS_E = \frac{Q_I + Q_F - Q_{IV}}{C_B^E Q_E}$	$CS_R = \frac{Q_I + Q_F - Q_{IV}}{C_A^R Q_R}$
Produtividade (g-dia <sup>-1</sup> /kg de FEQ)	$PR_E = \frac{Q_E C_B^E}{V_a}$	$PR_R = \frac{Q_R C_A^R}{V_a}$

As variáveis das definições da Tabela 2.1 são descritas a seguir: A e B são os componentes A e B, respectivamente; E é a corrente de extrato, I e IV são as Zonas I e IV do sistema contínuo, respectivamente; F é a corrente de alimentação, R é a corrente de refinado, c é a concentração do soluto na fase líquida (g/L), Q é a vazão volumétrica (mL/min), CS é o consumo de solvente (L/g), V<sub>a</sub> é o volume do adsorvente (mL), p é a pureza (%) e PR é a produtividade(g/dia.L de adsorvente).

## 2.3 APLICAÇÕES

Como delineado anteriormente, o Leito Móvel Simulado (LMS) é um sistema de separação por adsorção operando continuamente com múltiplas colunas e que aumenta a produção, a pureza e o rendimento quando comparamos com a separação em batelada. Atualmente, LMS tem sido aplicado também para a separação de diversas misturas na indústria biotecnológica e farmacêutica. As aplicações do LMS às

escalas preparativas e de produção em Química Fina e fármacos estão ganhando importância, especialmente, na separação de enantiômeros segundo Schulte e Strube (2001). Novos desafios para essa tecnologia são encontrados na separação de biomoléculas e alguns exemplos de aplicação abrangem proteínas terapêuticas e anticorpos como verificamos na contribuição de Keßler et al. (2007), além de nucleosídeos segundo Abel et al. (2004) e DNA de acordo com Paredes et al. (2007).

### 2.3.1 Metodologia Geral para a Obtenção de Dados Cromatográficos

Os experimentos de injeção de amostras e obtenção dos picos cromatográficos com soluções diluídas permitem a obtenção dos parâmetros estão definidos na Tabela 2.2.

**Tabela 2.2:** Parâmetros cromatográficos obtidos a partir de dados experimentais com soluções diluídas (adsorção linear)

Parâmetro	Equação
Fator de retenção	$k'_i = \frac{t_{R,i} - t_0}{t_0}$
Seletividade	$\alpha = \frac{k'_2}{k'_1}$
Assimetria	$A_s = \frac{B}{A}$
Resolução	$R_S = 2 \frac{(t_{R,2} - t_{R,1})}{(W_{b,1} + W_{b,2})}$
Número de pratos	$N_p = 5,54 \left( \frac{t_{R,i}}{W_{b1/2,i}} \right)^2$

A Tabela 2.3 mostra outros parâmetros cromatográficos obtidos a partir de dados a partir de pulsos com traçadores e na Tabela 2.4 constam as principais equações utilizadas para cálculos importantes em cromatografia.

**Tabela 2.3:** Outros parâmetros cromatográficos obtidos a partir de dados a partir de pulsos com traçadores injetados nas colunas cromatográficas

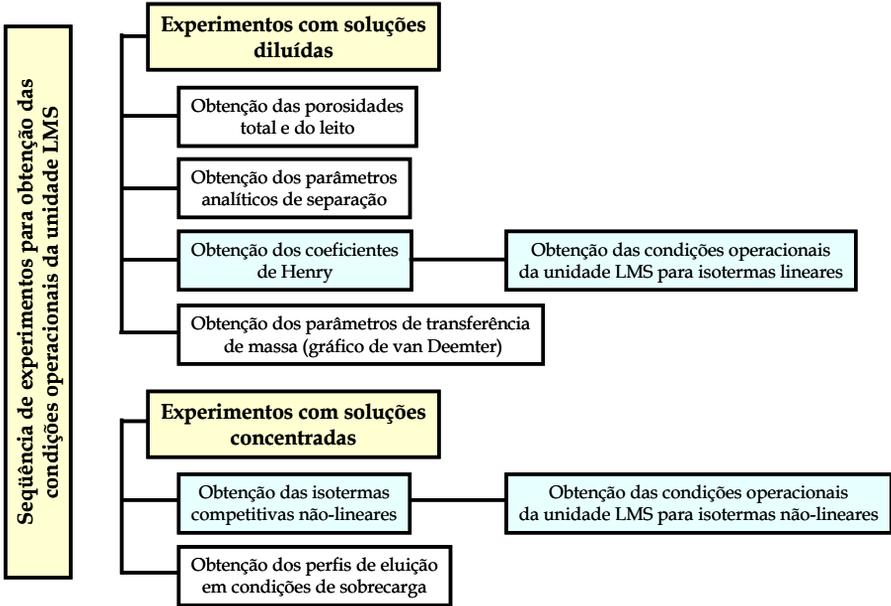
Parâmetro	Determinação experimental dos parâmetros do modelo
$\varepsilon_T$ $\varepsilon$	Experimentos de pulsos cromatográficos com traçadores que penetram e que não penetram nos poros
$\varepsilon_p$	Pela definição $\varepsilon_T = \varepsilon + (1 - \varepsilon)\varepsilon_p$
$H$	Experimentos de pulsos com o soluto de interesse
$k_m$ e $D_L$	Inclinação e interseção da reta obtida no gráfico do HETP <i>vs</i> $u$
$b_1$ e $b_2$	Ajuste do modelo de isoterma competitiva de Langmuir

**Tabela 2.4:** Equações para os cálculos de outros parâmetros cromatográficos obtidos a partir de dados a partir de pulsos com traçadores injetados nas colunas cromatográficas

Parâmetro	Equação
Porosidade total e do leito	$\varepsilon_T = \frac{t_{0,p}Q}{V_C} \quad \varepsilon = \frac{t_{0,p}Q}{V_C}$
Coefficiente de Henry (ou coeficiente de equilíbrio linear)	$t_{R,i} = t_{0,p} \left( 1 + \frac{1 - \varepsilon_T}{\varepsilon_T} \right) H_i$
Parâmetros de transferência de massa	$HETP = \frac{L_C}{N_p} \quad K = \varepsilon_p + (1 - \varepsilon_p) H_i$ $HETP = \frac{2D_L}{u} + 2u \left( \frac{\varepsilon}{1 - \varepsilon} \right) \frac{1}{K_m} \left[ 1 + \left( \frac{\varepsilon}{1 - \varepsilon} \right) \frac{1}{K} \right]^{-2}$

A Figura 2.7 mostra um diagrama esquemático da sequência de experimentos a serem realizados em uma coluna. Esses experimentos são divididos, geralmente, em duas etapas: a primeira etapa corresponde a experimentos com soluções diluídas e a segunda corresponde a experimentos com soluções concentradas. As informações obtidas nesses dois conjuntos de experimentos são úteis para o cálculo das regiões de separação, o projeto de condições operacionais pelo modelo do leito móvel denominado de verdadeiro (LMV) e a previsão de separação utilizando os modelos do Leito Móvel Simulado (LMS).

**Figura 2.7.** Sequência de experimentos em uma única coluna para determinação de parâmetros utilizados para o cálculo das regiões de separação e determinação das condições operacionais pelo modelo do LMV e predição de separação utilizando os modelos do LMV e do LMS.



O método utilizado na determinação da isoterma não-linear consiste na obtenção dos tempos de retenção formados pelos picos dos pulsos analíticos e os tempos de retenção à meia altura das frentes dos picos formados pelas injeções de sobrecarga. A partir da obtenção dos tempos de retenção no modo analítico e no modo de sobrecarga nas duas, os dados encontrados foram inseridos no software desenvolvido pela Novasep, chamado de Help. Esse programa está baseado no trabalho de Nicoud e Seidel-Morgenstern (1996) e considera uma isoterma que representa a adsorção competitiva e não competitiva em tipos diferentes de sítios de adsorção, que é característica de separações quirais. A equação geral da isoterma é dada por:

$$q_i = \lambda_i C_i + \frac{q_s b_i C_i}{1 + \sum_{j=1}^k b_j C_j} \quad (2.21)$$

onde  $q_i$  é a quantidade de soluto adsorvida,  $q_s$  o valor dessa quantidade na saturação,  $C_i$  a concentração da solução  $\lambda_i$  o coeficiente da isoterma linear e  $b_j$  os coeficientes experimentais da isoterma bi-Langmuir.

### 2.3.2 Estudo de Caso: Separação de Enantiômeros em LMS aplicado à separação e purificação do anestésico cetamina

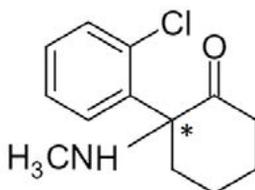
A cetamina (cloridrato de DL-2-(0-clorofenil)-2-(metilamino)ciclohexano) é um fármaco que tem rápida ação sobre o sistema nervoso central e que induz anestesia dissociativa, isto é, estado de sedação e amnésia durante o qual o paciente embora possa parecer desperto está dissociado do ambiente. Esse fármaco tem se mostrado útil em procedimentos diagnósticos e cirurgias superficiais de curta duração que precisam de intensa analgesia, como a troca de curativos em grandes queimaduras. Os enantiômeros da cetamina apresentam efeitos diferentes sendo a S-cetamina cerca de quatro vezes mais potente em analgesia que a R-cetamina (Yanagihara et al., 2000). Os efeitos da cetamina sobre o sistema nervoso central estão intimamente relacionados com a sua potente ação analgésica e com a indução de sonhos e alucinações como efeitos colaterais (Silva Jr, 2008), sendo estes atribuídos ao isômero R quando o fármaco é administrado sob a forma de racemato (Nisidzawa et al., 2000).

Na Figura 2.8 é apresentada a estrutura química da cetamina. A cetamina utilizada neste trabalho foi gentilmente fornecida pela Cristália Indústrias Farmacêuticas (Itapira, SP) tanto na forma de mistura racêmica quanto na forma de enantiômeros puros.

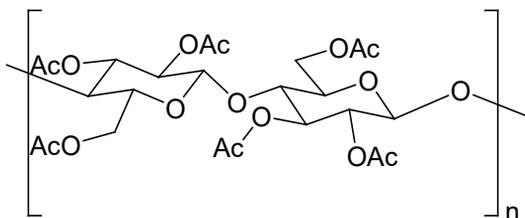
O adsorvente utilizado na separação consiste no acetato de celulose microcristalino, conhecido na literatura pela sigla MCTA,

que vem do termo em inglês “*Microcrystalline Cellulose Triacetate*”. Ele foi escolhido devido ao seu baixo custo, em comparação com outras fases estacionárias quirais, e à sua relativa ampla aplicabilidade. O MCTA é um material que resulta da acetilação heterogênea da celulose microcristalina, ou seja, da reação sem a dissolução dela. A reação conduzida em condições heterogêneas preserva grande parte da estrutura microcristalina que existia na celulose. A Figura 2.9 mostra a estrutura química do MCTA.

**Figura 2.8.** Estrutura química da cetamina. O símbolo (\*) representa o centro de quiralidade da molécula.



**Figura 2.9.** Estrutura química do MCTA



A fase móvel utilizada foi etanol grau HPLC no qual a cetamina e o 1,3,5, tri-*tert*-butilbenzeno (TTBB) são facilmente dissolvidos. As partículas do adsorvente possuem diâmetros médios entre 15 e 25 $\mu$ m. Colunas de aço inox (20 x 0,77 cm) foram empacotadas com MCTA empregando metanol como solvente. Já a cetamina foi dissolvida em etanol.

As somas das concentrações dos dois enantiômeros no extrato e no refinado foram monitoradas com detetor UV/VIS (Shimadzu SPD-10AV). A diferença entre as concentrações dos enantiômeros nas amostras foi determinada com detetor polarimétrico (Jasco P-1010) também equipado com célula de escoamento. A combinação das duas medidas permitiu a obtenção das concentrações individuais de cada enantiômero.

As purezas das amostras coletadas nos experimentos foram determinadas em sistema cromatógrafo HPLC equipado com detetor Shimadzu (modelo SPD-10AV) e duas bombas Shimadzu (SPD-10AS). As purezas são obtidas como médias durante o tempo de coleta. As colunas (20 x 0,46 cm) usadas para as determinações com o HPLC foram empacotadas com a mesma fase estacionária (MCTA) empregada nas colunas do LMS.

#### **a- Caracterização das colunas e parâmetros das isotermas de adsorção.**

Experimentos em batelada no mesmo sistema HPLC descrito anteriormente foram efetuados de modo a obter as características das 8 colunas e os dados das isotermas de adsorção. Cada coluna a ser empregada no sistema LMS foi caracterizada com relação às porosidades e aos coeficientes de Henry utilizando experimentos de pulso com o composto inerte TTBB segundo Santos et al. (2004). Os dados de equilíbrio não-linear foram apresentados por Silva Jr. et al. (2005). Os resultados das caracterizações são mostrados nas Tabelas 2.5 e 2.6. É importante observar que os valores relativamente altos das seletividades ( $\alpha$ ) entre os dois enantiômeros indicam um potencial importante para a obtenção de purezas elevadas.

**Tabela 2.5:** Características das 8 colunas da unidade LMS

Coluna	$t_0$ (min)	$\epsilon_T$	$t_R$ (min)		Coeficientes de Henry (H)		Seletividade ( $\alpha$ )
			R	S	R	S	
1	6,00	0,64	21,60	12,87	4,71	2,07	2,3
2	5,99	0,64	22,39	13,41	4,93	2,23	2,2
3	6,16	0,66	23,73	14,36	5,57	2,60	2,1
4	6,53	0,70	23,41	14,22	6,07	2,76	2,2
5	6,39	0,69	23,91	15,75	5,99	3,20	1,9
6	6,26	0,67	23,57	15,98	5,67	3,18	1,8
7	6,41	0,69	24,04	15,53	6,08	3,15	1,9
8	6,42	0,68	23,46	15,00	5,89	2,97	2,0
Média	6,27	0,67	23,30	14,40	5,60	2,70	2,0

**Tabela 2.6:** Parâmetros da isoterma de adsorção (modelo de Langmuir) para cetamina em MCTA a 25°C.

Parâmetros de adsorção	S	R
$q_m$	14 ± 1	65 ± 10
b	0,20 ± 0,02	0,11 ± 0,03

**b- Corridas experimentais no LMS**

Antes da realização das corridas experimentais no sistema LMS mostrado na Figura 2.6, foram calculadas, de acordo com os fundamentos apresentados anteriormente, as condições experimentais (quociente entre as vazões de líquido e sólido). Para isso foi utilizada a teoria do triângulo baseada no equilíbrio.

As vazões das correntes de extrato e refinado foram medidas continuamente durante cada ciclo. O monitoramento *on-line* das medidas de UV/Vis e polarímetro foram realizados para o

acompanhamento o comportamento das concentrações de cada enantiômero. O monitoramento *off-line* do extrato, do refinado e da corrente de eluente foi efetuado com o sistema externo de HPLC para confirmar os dados *on-line*. A utilização de amostras coletadas na saída das 8 colunas ao longo das mudanças consecutivas, permitiu a construção do perfil interno de concentrações.

O desempenho de separação em unidades LMS é fortemente dependente das características de empacotamento das colunas. Para colunas muito heterogêneas o movimento periódico do sistema das correntes de entrada e saída causam mudanças no desempenho da separação para cada seção durante os ciclos de operação. A Tabela 2.7 indica as porosidades médias para cada seção durante cada troca. Esses valores foram calculados de acordo com os valores experimentais das porosidades de cada coluna já apresentada. Essa tabela indica cinco diferentes valores das porosidades ou seja: 0,64, 0,65, 0,67, 0,68 e 0,69, que correspondem a um conjunto com pequena heterogeneidade, o que é uma característica importante para uma boa eficiência do processo global de separação.

**Tabela 2.7.** Médias das porosidades por seção em cada troca

	Troca 1	Troca 2	Troca 3	Troca 4	Troca 5	Troca 6	Troca 7	Troca 8
Seção 1	0,64	0,65	0,68	0,69	0,68	0,68	0,69	0,67
Seção 2	0,68	0,69	0,68	0,68	0,69	0,67	0,64	0,65
Seção 3	0,68	0,68	0,69	0,67	0,64	0,65	0,68	0,69
Seção 4	0,69	0,67	0,64	0,65	0,68	0,69	0,68	0,68

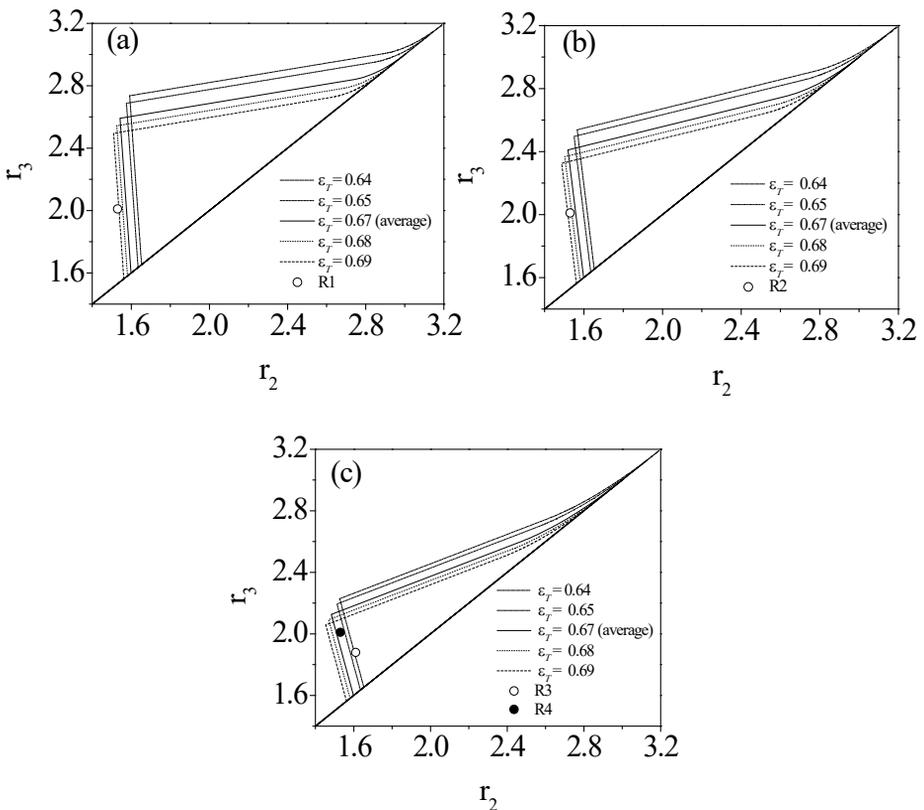
### c- Predição das condições de operação com o modelo simplificado

O efeito da concentração da alimentação na região de separação completa já foi bem estudado por Mazzotti et al. (1997), Migliorini et al. (1998) e Yu e Ching, (2003). A região de separação fica reduzida com

o acréscimo da concentração de alimentação devido aos efeitos da não-linearidade das isothermas de adsorção. A região ideal para a separação pode ser observada na Figura 2.10. Os pontos experimentais ( $m_2$ ,  $m_3$ ) de operação foram selecionadas de modo a obter S-cetamina com alta pureza na região do refinado.

As condições experimentais para as corridas realizadas estão colocadas na Tabela 2.8.

**Figura 2.10.** Regiões de separação baseadas na teoria do equilíbrio para diferentes concentrações da alimentação e porosidades medias em cada seção: (a) Região de separação para 1,5g/L, (b) Região de separação para 2,5 g/L e (c) Região de separação para 5 g/L.



**Tabela 2.8:** Condições experimentais para as corridas com cetamina no LMS

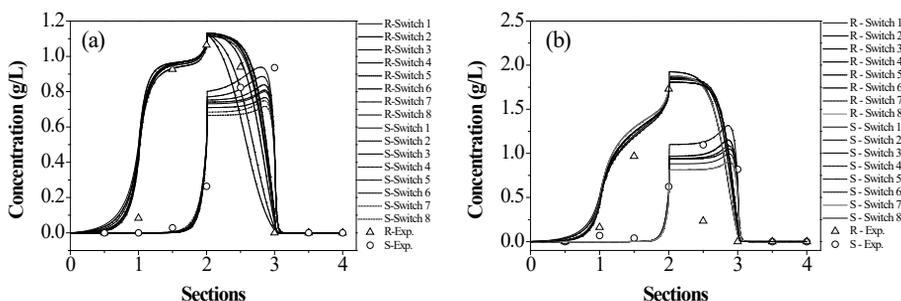
Corrida	$c_F$ (g/L)	$t^*$ (min)	Vazões (mL/min)					$m_1$	$m_2$	$m_3$	$m_4$
			$Q_I$	$Q_{IV}$	$Q_R$	$Q_X$	$Q_F$				
R1	1,5	25	1,10	0,38	0,43	0,47	0,18	2,79	1,53	2,01	0,86
R2	2,5	25	1,10	0,38	0,43	0,47	0,18	2,79	1,53	2,01	0,86
R3	5,0	25	1,10	0,37	0,39	0,44	0,10	2,79	1,61	1,88	0,83
R4	5,0	25	1,10	0,38	0,43	0,47	0,18	2,79	1,53	2,01	0,86

#### d- Experimentos no LMS em condições de não-linearidade

A formulação matemática para concentrações mais elevadas necessita levar em conta a não-linearidade das isotermas e os efeitos de transferência de massa que ocorrem no espaço entre fluidos e partículas sólidas. Tratamentos detalhados para situações em que o sistema obedece à isoterma de Langmuir e à dispersão axial pode ser encontrado em Rodrigues (2015), Santana et al., (2009) e Santana et al. (2020). A pureza para cada condição experimental pode então ser determinada pelo enfoque de LMV com o efeito da não-linearidade das isotermas e os efeitos não ideais na transferência de massa.

A Figura 2.11 mostra os resultados simulados e experimentais do perfil interno de concentrações no estado estacionário de operação para as condições  $m_2$  e  $m_3$  (ver Tabela 2.10). A evolução das concentrações ao longo das colunas no final do último ciclo foi comparada com valores obtidos matematicamente pelo enfoque LMV considerando as porosidades médias e os efeitos de não-linearidade. Os valores experimentais e calculados são apresentados na Tabela 2.9.

**Figura 2.11.** Perfil de concentrações experimentais e simulado: (a) Corrida experimental 2 e (b) Corrida experimental 3. Os símbolos  $\Delta$  indica o extrato e  $\circ$  o refinado.



**Tabela 2.9.** Valores das purzas das correntes obtidas pela predição e experimentação.

Trocac	R1		R2		R3		R4	
	P <sub>X</sub> (%)	P <sub>R</sub> (%)						
1	99,2	99,9	92,7	100,0	87,8	100,0	96,0	75,7
2	99,2	99,9	94,0	100,0	87,6	100,0	94,3	72,5
3	98,7	99,9	87,2	100,0	84,6	100,0	92,4	72,9
4	99,8	99,9	97,2	100,0	92,0	100,0	91,0	70,8
5	99,9	99,9	99,9	100,0	99,1	100,0	89,5	70,2
6	99,9	99,8	99,8	100,0	97,4	100,0	89,3	68,4
7	99,5	99,4	90,8	100,0	98,0	100,0	87,0	65,2
8	98,0	99,6	84,9	100,0	98,5	100,0	86,0	66,0
Média	99,3	99,8	93,3	100,0	93,1	100,0	90,7	70,2
Experimental	> 99,5	> 99,5	98,0	> 99,5	96,0	99,0	95,0	70,0
Desvio (%)	0,2	0,3	4,8	0,5	3,0	1,0	4,5	0,3

Em geral, os resultados experimentais no LMS mostram uma boa separação dos enantiômeros da cetamina e com altas purezas no extrato e no refinado. Podemos também observar que o enfoque LMV levando em conta efeitos não-lineares efetua uma predição adequada do desempenho do LMS na separação da cetamina

## 2.4 CONCLUSÕES

Os processos de separação são críticos em diversos processos biotecnológicos e, em geral, mais da metade do capital investido em uma planta industrial corresponde a separação e a purificação. Adsorção e cromatografia são operações controladas pela concentração e possuem um crescimento importante desde o sucesso no escalonamento de processos contínuos usando o conceito de LMS. O crescimento de produtos biotecnológicos dentro do campo farmacêutico é um exemplo destacado de como desenvolvimentos recentes nessa área estão impactando favoravelmente o mercado. Tal resultado pode ser observado pela adoção dessas novas tecnologias na separação de moléculas quirais por diversas empresas do ramo com desenvolvimentos industriais que antes só era oferecida em escala de laboratório. As pesquisas científicas cobrem a maior parte dos métodos de separação e os pesquisadores e empresas expandiram a faixa de escala, ademais a integração de processos tem trazido um potencial significativo para os novos processos de separação por adsorção. O advento de adsorventes com maior capacidade de adsorção como os denominados Metal Organic Frameworks (MOFs) deverá contribuir com um salto importante para a redução do tamanho das unidades industriais, de acordo com revisão recente efetuadas por Zhao et al. (2015).

# LEITURA COMPLEMENTAR



Para um aprofundamento e/ou revisão dos conceitos básicos explanados neste capítulo, os autores sugerem a leitura das seguintes publicações:

Subramanian, G. Ed., **Chiral Separations Technique, A practical Approach**, Wiley-VCH, Weinheim, Germany, 2001, 618p.

Rodrigues, A.E., Ed. **Simulated Moving Bed Technology: Principles, Design and Process Applications**, **Butterworth-Heinemann**, London, 2015, 304 p.

Schmidt-Traub, Ed. **Preparative Chromatography of Fine Chemicals and Pharmaceutical Agents**, Wiley-VCH, Weinheim, Germany, 2005, 458p.

Pessoa Jr., A., Kilikian, B.V. **Purificação de Produtos Biotecnológicos**, 2ª. Edição, Edgard Blucher, São Paulo, 2019, p., 760.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio com a Bolsa de Produtividade Científica nível Sênior no. 330990/2018-9 e à Fapesp com apoio do Projeto Temático Proc. no. 20007/02872-4.

## REFERÊNCIAS

Abel, S., Bähler, M.U., Arpagaus, C., Mazzotti M., Stadler, J. Two-fraction and three-fraction continuous simulated moving bed separation of nucleosides. **Journal of Chromatography A**. 1043: 201-210, 2004.

Azevedo, D.C.S., Rodrigues, A.E. **Fructose–glucose separation in a SMB pilot unit**: Modeling, simulation, design, and operation. *AIChE J.* 47: 2042-2051, 2001.

Broughton, D.B., Gerhold, C. G., **Continuous sorption process employing fixed bed of sorbent and moving inlets and outlets**, U.S. Pat. 2,985,589, 1961.

Guiochon, G., Shirazi, S. G., Katti, A.M. **Fundamentals of Preparative and Nonlinear Chromatography**, Academic Press, London, 1994, 701p.

Keßler, L.C., Gueorguieva, L., Rinas, U., Seidel-Morgenstern, A. Step graients in 3-zone Simulate Moving Bed Chromatography: application to the purification of antioibes an bone morphogenetic protein-2. **Journal of Chromatography A**. 1176: 69-78, 2007.

Li, P. Xiu, G., Rodrigues, A.E. , Proteins separation and purification by salt gradient ion-exchange SM. **AIChE Journal**. 53: 2419-2431, 2007.

Li, P., Xiu, G., Rodrigues, A.E. Proteins separation and purification by salt gradient ion-exchange SMB. **AIChE J.** 53: 2419-2431, 2007.

Mallmann, T., Burris, B.D., Ma, Z., Wang, N.H.L. Standing wave design of nonlinear SMB systems for fructose purification, **AIChE Journal**. 44: 2628-2646, 1998.

Mazzotti, M., Storti, G., Morbidelli, M. Optimal operation of simulated moving beds for nonlinear chromatographic separations. **Journal of Chromatography A**. 769: 3-24, 1997.

Migliorini, C., Mazzotti, M., Morbidelli, M. Continuous chromatographic separation through simulated moving beds under linear and nonlinear conditions. **Journal of Chromatography A**. 827: 161-173, 1998.

Nicoud, R. M., Simulated Moving-Bed Chromatography for Biomolecules, In: Ahuja, S. Ed., **Handbook of Bioseparations**, Academic Press, San Diego, p. 475-509, 2000.

Nicoud, R. M., Seidel-Morgenstern, A. **Adsorption Isotherms: Experimental Determination and Application to Preparative Chromatography**. Isolation and Purification. 2: 165-200, 1996.

Nishizawa, N., Nakao, S., Nagata, A., Hirose, T., Masuzawa, M., Shingu, K. the effect of ketamine isomers on both mice behavioral responses and c-Fos expression in the posterior cingulate and retrosplenial cortices. **Brain Research**. 857: 188-192, 2000.

Paredes, G., Mazzotti, M. Optimization of simulated moving bed purification step and column chromatography for a plasmid DNA and for a chiral separation. **Journal of Chromatography A**. 1142: 56-68, 2007.

Rodrigues, A.E., Ed. ,**Simulated Moving Bed Technology: Principles, Design and Process Applications**, Butterworth-Heinemann, London, 2015, p. 304.

Santana, C.C., Azevedo D.C.S., A. E. Rodrigues, A.E., In: Pessoa Jr, A., Kilikian, B.V eds., **Purification de produtos biotecnológicos**. Editora Blucher, São Paulo, 2020, p. 487-529.

Santana, C.C., Silva Jr, I.J., Azevedo, D.C.S., Barreto Jr., A.G, **Adsorption in simulated moving beds**, in: Encyclopedia of industrial biotechnology: Bioprocesses and Bioseparation. 7: 1002-1031, 2009.

Santos, M.A.G., Veredas, V., Silva Jr., Correia, C.D.R., Furlan, L.T., Santana, C. C. Simulated moving-bed adsorption for separation of racemic mixtures. *Brazilia Journal of Chemical Engineering*. 21: 127-136, 2004.

Schulte, M., Strube, J. Preparative enantioseparation by simulate moving be chromatography. *Journal of Chromatography A*. 906: 399-416, 2001.

Silva Jr, I.J., Santos, M.A. Veredas, V., Santana, C.C, **Experimental determination of chromatographic separation parameters of ketamine enantiomers on MCTA**. Separation and Purification Technology. 43: 103-110, 2005.

Silva Jr., I.J., Sartor, J.P., Barreto Jr., A.G., Santana, C.C. , **Chromatographic separation of chiral drugs in diallyl tartadamide based stationary phase**. Adsorption Science and Technology. 25: 769-779, 2008

Veredas, V., Carpes, M.J.S., Correia, C.R.D., C. C., Santana, C.C. Continuous chromatographic separation of a baclofen precursor in a simulated moving bed using a polyssacharide carbamate as chiral stationary phase. *Journal of Chromatography A*. 119: 156-162, 2006.

Yanagihara, Y., Ohtani, M., Kariya, S., Uchino, K., Aoyama, T., Yamamura, Y., Iga, T. Stereoselective high-performance liquid chromatographic determination of ketamine and its active metabolic, norketamine, in humam plasm. *Journal of Chromatography B*. 746: 227-231, 2000.

Yu, H.W., and Ching, C.B. **Modeling, simulation and operation performance of a simulated moving bed for enantioseparation of fluoxetine on new  $\beta$ -cyclodextrin columns**. Adsorption. 9: 213- 223, 2003.

Zenoni, G., Pedferri, G.,M., Mazzotti M., Morbidelli, M. On line monitoring of enantiomer concentrationin chiral simulated moving bed chromatography. **Journal of Chromatography A**. 888: 73-83, 2000.

Zhao, J., Li, H., Han, Y., Li, R., Ding, X., Feng, X., Wang, B. Chirality from substitution: enantiomer separation via a modified metal-organic framework. **Journal of Materials A**. 3: 12145-12148, 2015.

# 3

## Separação cromatográfica preparativa em sistema contínuo Varicol: estudos de casos com moléculas quirais

Cesar Costapinto Santana<sup>1,2</sup>

Ivanildo José Silva Jr.<sup>3</sup>

Amaro Gomes Barreto Jr.<sup>4</sup>

1 Universidade Tiradentes –  
Av. Murilo Dantas 300, Farolândia. Aracaju Sergipe, Brasil. 49032-490.

2 Universidade Estadual de Campinas –  
Cidade Universitária Zeferino Vaz, Barão Geraldo. Campinas-São Paulo,  
Brasil. 13083-872.

3 Universidade Federal do Ceará, Fortaleza - CE, Brasil CEP 60455 -760.

4 Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro - RJ, Brasil.  
CEP 21941-596.



# RESUMO

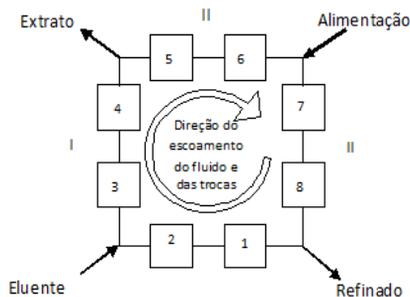
**N**a sequência aos estudos sobre sistemas contínuos contracorrente para a separação cromatográfica, apresentamos aqui uma proposta de conceito com modificação ao Leito Móvel Simulado (LMS) introduzindo o modo Varicol. A diferença principal entre o LMS e o Varicol é que neste último a injeção e os pontos de coleta não se movem simultaneamente. Isso faz com que o número de colunas em cada zona de separação flutue no tempo, enquanto o número de colunas em cada zona é mantido constante no processo LMS. O Varicol tem a característica de otimizar o uso da fase estacionária e reduz a quantidade de eluente empregado, gerando um processo mais econômico. A aplicação desse conceito é demonstrada com o estudo de casos de separação e purificação de três misturas racêmicas de enantiômeros de interesse no campo farmacêutico: o neoplásico mitotano, o agente eficaz no tratamento de doenças cardiovasculares verapamil e o binol, que é intermediário de sínteses assimétrica. Foi realizada a separação dos enantiômeros com pureza elevada e na escala de gramas/dia desses compostos.

## 3.1 INTRODUÇÃO

### 3.1.1 Metodologia Experimental com o Uso do Sistema Varicol

Os sistemas LMS são caracterizados pelo movimento sincronizado das correntes de entrada e de saída mantendo-se as relações equivalentes com o LMV. No LMS o número de colunas em cada seção permanece constante, o que significa que o comprimento de cada seção não se modifica com o tempo, e isso permite caracterizar um processo LMS especificando o modo em que as colunas se distribuem entre as seções. Por exemplo, uma configuração 2-2-2-2 representa um sistema com um total de oito colunas contendo duas colunas em cada seção, como mostrado na Figura 3.1. No LMS essa configuração se mantém enquanto o tempo de processo prossegue, por exemplo, entre um tempo  $t$  e um tempo  $t+\Delta t$ .

**Figura 3.1.** Sistema LMS com oito colunas e quatro seções com a configuração 2-2-2-2.



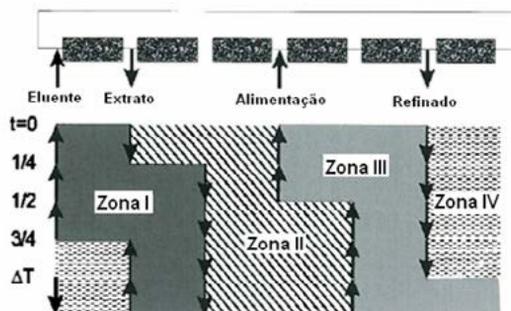
O processo denominado Varicol (comprimento de coluna variável) foi patenteado por Adam *et al.* (2000), atuando como pesquisadores da empresa Novasep. Esse processo apresenta como principal inovação as unidades contínuas operando com o avanço da alimentação e a retirada das correntes em um modo não sincronizado como delineado por Pais

e Rodrigues (1998). Com essa inovação o comprimento das colunas e a configuração não é mantida ao longo do período de operação. A diferença principal entre o LMS e o Varicol é que nesse último a injeção e os pontos de coleta não se movem simultaneamente. Esse procedimento faz com que o número de colunas em cada zona de separação flutue no tempo, enquanto no processo LMS o número de colunas em cada zona é mantido constante no processo. Desse modo o Varicol otimiza o uso da fase estacionária e, geralmente, reduz a quantidade de eluente o que se traduz em economicidade no processo e aumento da concentração dos produtos.

O processo de separação pode ser separado em quatro zonas: Zona I: entre a linha do eluente e a linha do extrato; Zona II: entre a linha do extrato e a linha da alimentação; Zona III: entre a linha da alimentação e a linha do refinado; e, Zona IV: entre a linha do refinado e a linha do eluente.

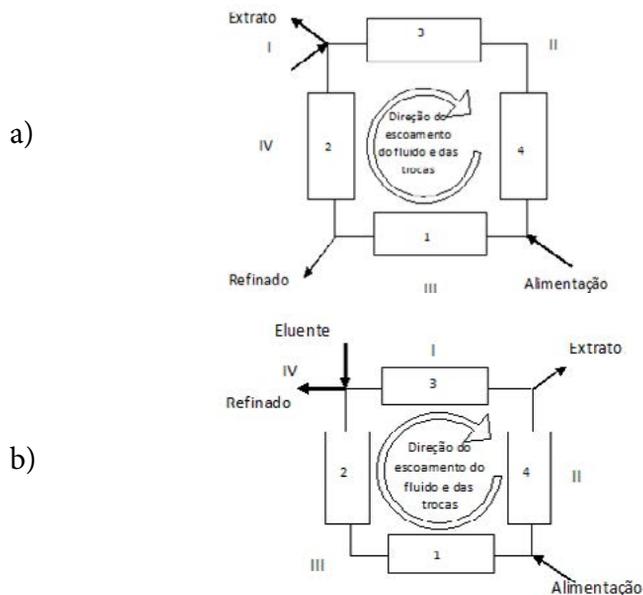
As linhas de alimentação, eluente, extrato e refinado são mudadas em determinados períodos  $\Delta t$ , seguindo um padrão não-simultâneo associado ao número médio de colunas requerido por zona durante o ciclo. Um ciclo completo é composto de períodos sucessivos, permitindo as diferentes linhas retornarem às suas posições iniciais. No Varicol, ao contrário do LMS, o número médio de colunas em no mínimo duas zonas é um número real, não necessariamente um número inteiro. Um exemplo de esquema de um Varicol com seis colunas é mostrado na Figura 3.2.

**Figura 3.2.** Esquema do funcionamento geral do Varicol com relação à entrada e saída das correntes em cada zona.



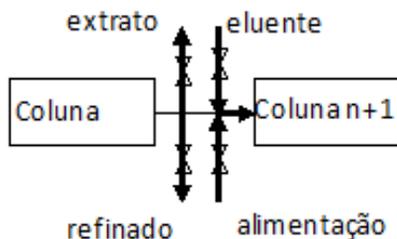
A operação de uma unidade Varicol está esquematizada na Figura 3.3 (a) e (b). A configuração do processo no instante  $t$ , Figura 3.3 (a), é caracterizado pela ausência de uma coluna na Zona I e a presença de duas colunas na Zona II e uma coluna nas Zonas III e IV. Nenhuma coluna está entre o ponto de entrada do eluente do ponto de saída do extrato. Essa distribuição de colunas permanece constante durante meio período. No tempo  $(t + 0,5 \Delta t)$  a saída as correntes de extrato e refinado muda simultaneamente, enquanto as correntes de eluente e alimentação não mudam. A nova configuração (Figura 3.3 b) é caracterizada pela ausência de coluna na Zona IV e pela presença de duas colunas na Zona III e uma coluna nas Zonas I e II. Essa configuração permanece constante até o final do período  $\Delta t$  e nesse momento a entrada do eluente e da alimentação muda, fazendo-se com que as correntes do extrato permanecer nas mesmas posições, o que conduz à configuração da Figura 3.3a.

**Figura 3.3.** Esquema de unidade Varicol. (a) nenhuma coluna na Zona I, 2 colunas na Zona II e 1 coluna nas Zonas III e IV. (b) 1 coluna nas Zonas I e II, 2 colunas na Zona III e nenhuma coluna na Zona IV.



Segundo observação de Ludemann-Hombourger *et al.* (2002) é importante enfatizar que entre cada coluna as duas correntes de saída precisam ser conectadas com a linha de reciclo antes das correntes do eluente e alimentação, e seguindo a direção da corrente de reciclo, segundo a Figura 3.4. Desse modo é evitada a contaminação das correntes de refinado e de extrato pela corrente de alimentação quando não houver coluna nas Zonas II e III, e é evitada a diluição do extrato e do refinado pelo eluente quando não houver colunas nas Zonas I e/ou IV.

**Figura 3.4.** Conexão das correntes e entrada e saída no processo Varicol.



Como resultado do mecanismo exposto, enquanto o LMS convencional mostra um número limitado de configurações com um mínimo de uma coluna por seção, o processo Varicol não exibe essa limitação e apresenta um número infinito de configurações. Esse fato faz com que as unidades Varicol sejam muito flexíveis e robustas quando comparadas com os LMS convencionais especialmente nos casos em que o número de colunas é pequeno.

### 3.1.2 Sistema Experimental Varicol-Micro

O sistema Varicol-Micro é um sistema de separação projetado para a separação contínua de produtos da química fina, fármacos (por exemplo: enantiômeros) e intermediários farmacêuticos, em escala de laboratório. O mesmo projeto lógico e programa operacional são aplicados tanto no Varicol-Micro como em outros sistemas Varicol.

Trabalhos de desenvolvimento podem ser transferidos para operações em escala maior. Dependendo da purificação a ser considerada, a capacidade do sistema pode ser de 1 a 50 g/dia.

O Varicol-Micro é equipado com a opção do sistema de controle avançado, permitindo que a unidade efetue um ajuste próprio dos principais parâmetros operacionais (vazões de reciclo) de modo a otimizar a pureza do componente alvo e também o desempenho do sistema.

O Varicol-Micro é um sistema de colunas múltiplas. Uma solução de mistura binária é bombeada continuamente nas colunas, enquanto os componentes purificados da mistura são continuamente retirados do sistema. Na cromatografia clássica, uma fase móvel é bombeada através de uma coluna contendo um adsorvente que é a fase estacionária e os componentes de uma mistura binária são separados porque eles se movem através da coluna com diferentes valores de velocidades. Se o adsorvente estiver se movendo na direção oposta à fase móvel a uma velocidade apropriada, o componente mais fortemente retido move-se com o adsorvente e o componente menos fortemente retido move-se com a fase móvel. Nos casos em que a mistura é continuamente injetada, os componentes da mistura serão continuamente separados, um componente ficando na fase líquida e o outro na fase sólida. Em geral, não é prático mover o sólido na direção oposta à fase líquida, mas é possível simular o movimento da fase sólida usando-se várias colunas conectadas em série e movendo os pontos de injeção e os pontos de retirada dos componentes utilizando válvulas.

O Varicol-Micro opera alternativamente com dois diferentes modos de processo: SMB (Leito Móvel Simulado) ou Varicol, e possui as seguintes especificações:

- 1) O sistema proposto Varicol-Micro pode utilizar de quatro a oito colunas com 10 milímetros de diâmetro interno.
- 2) O número de colunas pode ser facilmente modificado pelo operador. Com número alto de colunas, purezas muito altas podem ser obtidas em ambas as saídas. Por outro lado, um número menor de colunas é preferível quando somente um enantiômero precisa ser muito puro, para aumentar a produtividade. Na maior parte dos

casos, purezas maiores que 98 a 99 % são obtidas simultaneamente no extrato e no refinado com um Varicol contendo oito colunas.

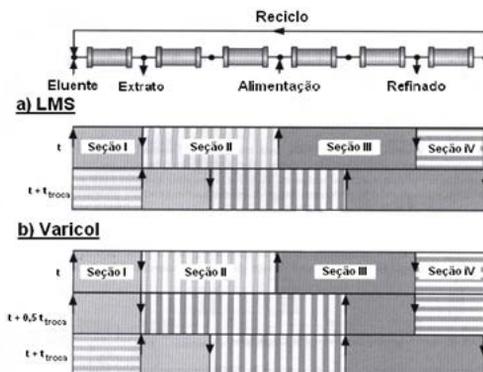
O sistema total é controlado por um programa específico de computador o qual é projetado para monitorar a purificação de acordo com regras de qualidade e segurança operacional.

O sistema físico do Varicol-Micro é constituído dos seguintes itens: bombas (cinco bombas), tubulações (de 1/16 e de 1/8 polegadas), válvulas, controle de temperatura, sensores, válvula de 6 vias, válvula de detecção e estrutura de aço inox, programa Help, computador, PLC Siemens, sistema de detecção UV (ultravioleta), polarímetro, e, colunas de 10 milímetros de diâmetro (oito colunas de 1 cm de diâmetro, supridas com empacotamento do tipo Chiralpak AD)

As dimensões máximas do sistema são: comprimento de 800 mm, profundidade de 600 mm, altura de 700 mm e peso aproximado de 120 kg. As necessidades de potência são de duas linhas de 220V, 50 Hz, 2 kW. Necessita de ar comprimido com 5,5 atm de pressão mínima com ar livre de óleo, consumo máximo de 1 a 3 m<sup>3</sup>, e conector de ¼ de polegada.

O diagrama básico que mostra a diferença em relação ao tempo de troca das posições no sistema se encontra na Figura 3.5.

**Figura 3.5.** Diagrama básico que mostra a diferença em relação ao tempo de troca das posições no sistema.



O sistema físico vem acompanhado de um software denominado de Help, que permite determinar ferramentas importantes de análise como a isoterma de adsorção a partir de dados básicos cromatográficos obtidos com uma coluna em laboratório. Esse software permite ainda projetar as vazões a serem alimentadas ao sistema e a predição de algumas variáveis importantes como o consumo de solvente e a produtividade esperada para o sistema de separação.

Uma fotografia da unidade Varicol-micro instalado no Laboratório de Cromatografia Preparativa da Faculdade de Engenharia Química da Unicamp é mostrada na Figura 3.6

**Figura 3.6.** Sistema Varicol instalado no Laboratório de Cromatografia Preparativa da Faculdade de Engenharia Química da Unicamp



## 3.2 DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS DA ISOTERMA

O método utilizado na determinação da isoterma não linear consistiu na obtenção dos tempos de retenção formados pelos picos dos pulsos analíticos e os tempos de retenção à meia altura das frentes dos picos formados pelas injeções de sobrecarga. A partir da obtenção dos tempos de retenção no modo analítico e no modo de sobrecarga com

a mesma fase estacionária, os dados encontrados foram inseridos no software desenvolvido pela Novasep, chamado de Help. Esse programa está baseado no trabalho de Nicoud e Seidel-Morgenstern (1996), e considera uma isoterma que representa a adsorção competitiva e não competitiva em tipos diferentes de sítios de adsorção, que é característica de separações quirais. A equação geral da isoterma é dada por:

$$q_i = \lambda_i C_i + \frac{q_s b_i C_i}{1 + \sum_{j=1}^k b_j C_j} \quad (3.1)$$

onde  $q_i$  é a quantidade de soluto adsorvida,  $q_s$  o valor dessa quantidade na saturação,  $C_i$  a concentração da solução  $\lambda_i$  o coeficiente da isoterma linear e  $b_j$  os coeficientes experimentais da isoterma bi-Langmuir.

### 3.3 DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS DA ISOTERMA

A queda de pressão total no sistema de colunas é uma variável importante para que seja limitada à vazão volumétrica máxima de operação. O cálculo aproximado dessa queda de pressão pode ser realizado pela equação de Ergun como apresentada por Bird *et al.* (2000):

$$\frac{\Delta p}{L} = \frac{150\mu(1-\varepsilon)^2}{\varepsilon^3 D_p^2} \times q + \frac{1,75\rho(1-\varepsilon)}{\varepsilon^3 D_p} \times q^2 \quad (3.2)$$

Na equação de Ergun a queda de pressão por unidade de comprimento  $\Delta P/L$  é obtida com o conhecimento do diâmetro médio das partículas  $D_p$ , da porosidade média do leito  $\varepsilon$ , da viscosidade  $\mu$  do fluido, da massa específica do fluido  $\rho$  e da velocidade superficial no

leito poroso  $q$  que é calculado pelo quociente entre a vazão volumétrica e a área da seção transversal da coluna.

Correlações mais precisas para o cálculo de  $\Delta P/L$  com partículas de pequenos diâmetros (abaixo de 0,1 mm) e baixas porosidades foram sugeridas por Massarani (1997) são baseadas na permeabilidade  $K$  do leito de partículas e se adaptam melhor às partículas utilizadas nesse trabalho. O cálculo a ser desenvolvido pela metodologia Massarani é realizado através das equações 3.3 e 3.4, apresentadas a seguir.

$$\frac{\Delta p}{L} = \frac{\mu}{K} \times q + \frac{c\rho}{\sqrt{K}} \times q^2 \quad (3.3)$$

$$c = \frac{1}{\varepsilon^{3/2}} \left[ 10^{-1} \left( \frac{10^{-6}}{K} \right)^{0,72} + 6 \times 10^{-2} \left( \frac{10^{-6}}{K} \right)^{0,13} \right]^{2/3} \quad (3.4)$$

O cálculo da permeabilidade  $K$  é realizado através de medidas de  $\Delta P/L$  para baixas velocidades superficiais  $q$  (região de linearidade entre  $\Delta P/L$  e  $q$ ) em um leito de partículas e aplicada a Lei e Darcy dos meios porosos, que corresponde ao termo linear da Equação 3.3, ou seja:

$$\frac{\Delta p}{L} = \frac{\mu}{K} \times q \quad (3.5)$$

## 3.4 DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS DA ISOTERMA

### 3.4.1 Separação dos Enantiômeros do Mitotano

Em função da obtenção de um conjunto coerente e completo de resultados fundamentais na separação do mitotano em uma coluna, já apresentados no Capítulo 1 desse livro, foi considerada como promissora a separação contínua com a realização de um conjunto de corridas experimentais no Sistema Varicol, de acordo com a metodologia apresentada anteriormente. Os resultados serão aqui utilizados para alimentar a metodologia o cálculo as condições operacionais do sistema contínuo.

A mistura racêmica de mitotano utilizada nos experimentos foi adquirida da Yick-Vik Chemicals and Pharmaceutics (China) e apresenta uma massa molar de 320,04 g/gmol. Serão apresentados a seguir os resultados que consideramos mais bem sucedidos para essa separação.

O processo para a determinação dos parâmetros da isoterma de Langmuir competitiva seguiu as seguintes etapas:

#### **a- Parâmetros Básicos da Coluna**

Na primeira etapa, dentro da janela de tela do Help mostrado Figura 3.7 foi inscrito as medidas dos parâmetros da coluna (diâmetro, comprimento, porosidade da coluna e tamanho da partícula) e a condição de injeção analítica (vazão e tempo de retenção dos enantiômeros).

**Figura 3.7.** Janela de entrada de dados adaptada do *Help* que se refere às medidas dos parâmetros da coluna e a injeção analítica.

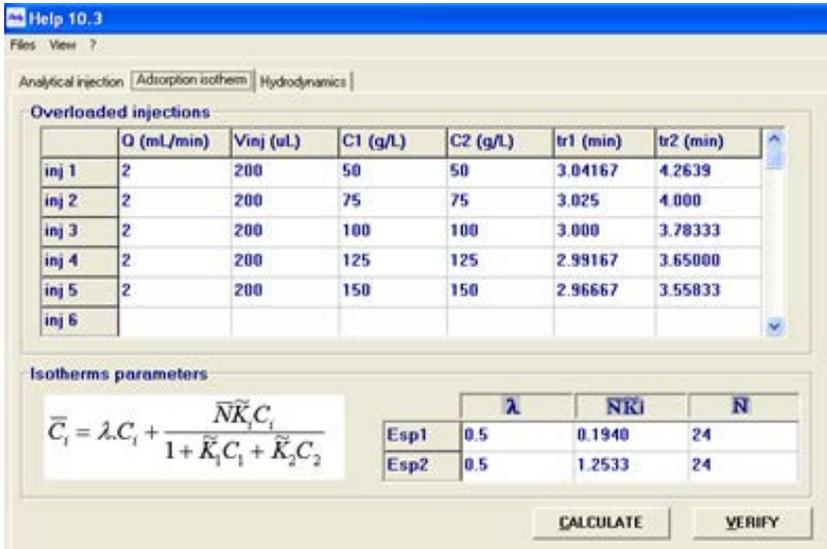
The screenshot shows a software window titled "Help 10.3" with a menu bar containing "Files", "View", and "?". Below the menu bar are three tabs: "Analytical injection" (selected), "Adsorption isotherm", and "Hydrodynamics". The main area is divided into two panels:

- Column parameters:**
  - Column diameter (cm): 1
  - Column length (cm): 10
  - Bed density (kg/L): 0.69
  - Particle size (um): 20
- Analytical injection:**
  - Flowrate (mL/min): 2
  - Retention time 1 (min): 3.206
  - Retention time 2 (min): 5.702

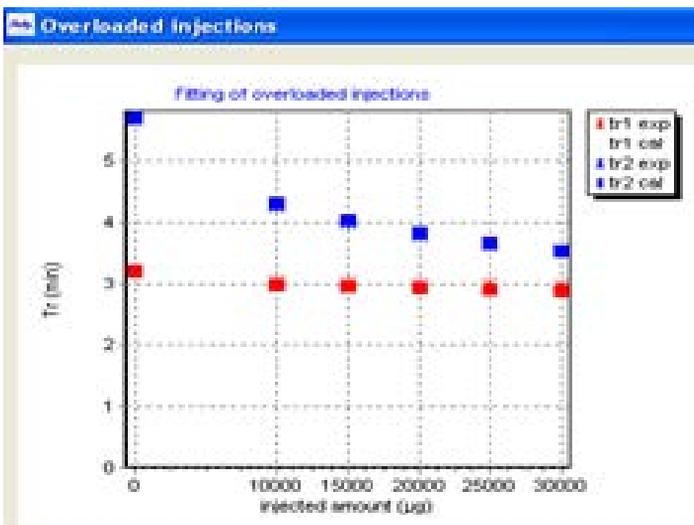
### b- Dados de Injeção com Soluções Concentradas

Na segunda etapa, foram inseridos os dados das injeções de sobrecarga que corresponde à Figura 1.14 do Capítulo 1 deste livro. Para o uso do programa *Help* de cálculo são necessários os dados de vazão, do volume injetado, da concentração dos enantiômeros e dos tempos de retenção a meia altura das frentes dos picos. Em seguida o botão “*calculate*” é pressionado (Figura 3.8), dando uma resposta dos valores dos parâmetros da isoterma de Langmuir competitiva. Na sequência o botão “*verify*” é pressionado, fornecendo assim a estimativa dos tempos de retenção em função da quantidade injetada do soluto calculada pelo modelo e utilizando os tempos experimentais, conforme a Figura 3.9.

**Figura 3.8.** Janela de tela com entrada e saída dos dados adaptados do Help que se refere às medidas de sobrecarga e os parâmetros da isoterma de adsorção.



**Figura 3.9.** Curva dos tempos de retenção em função da quantidade injetada de soluto sobre condições de sobrecarga adaptado do Help.



### c- Eficiência da coluna, e dados de entrada de vazão e pressão

As medidas da eficiência da coluna, a vazão e a pressão exercida dentro da coluna foram inseridas no Help, em seguida o botão “calculate” é pressionado e são fornecidos os coeficientes da equação van Deemter para a altura equivalente a um prato teórico determinado pela Equação 3.6:

$$H = \frac{2D_L}{u} + 2u \left( \frac{\varepsilon}{1-\varepsilon} \right) \frac{1}{Kk_m} \left[ 1 + \left( \frac{\varepsilon}{1-\varepsilon} \right) \frac{1}{K} \right]^{-2} \quad (3.6)$$

onde  $D_L$  é o coeficiente de dispersão axial da coluna;  $k_m$  o coeficiente de transferência de massa global.

Nessa equação estão incluídos dados de eficiência cromatográfica em termos de altura equivalente a um prato teórico e a queda de pressão dos dados obtidos experimentalmente, conforme Figura 3.10.

**Figura 3.10.** Quadro de entrada e saída de dados da eficiência da coluna a da queda de pressão adaptada do *Help*.

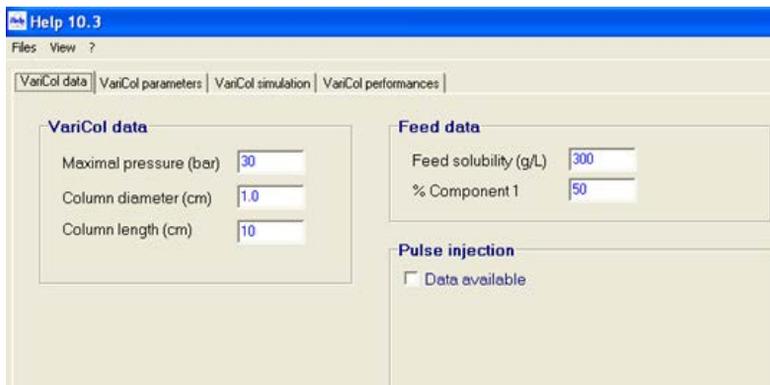
The screenshot shows a software window titled "Help 10.3" with a menu bar (File, View, ?) and a tabbed interface. The "Hydrodynamics" tab is active. It contains two main sections:

- Column efficiency:**
  - Flowrate (mL/min): 2 (input) and 3 (output)
  - Number of plates: 507 (input) and 425 (output)
  - Buttons: CALCULATE, VIEW
  - Results: HETP (cm) = 1.4 (output), dp (cm) = 0.52998 (output), u (cm/sec) (output)
- Pressure drop:**
  - Flowrate (mL/min): 1 (input)
  - Pressure (bar): 55 (input)
  - Button: CALCULATE
  - Results:  $\frac{\Delta P}{L}$  (bar/cm) = 2.75613 (output), u (cm/sec) (output)

#### d- Dados Típicos para as Corridas Iniciais Visando a Separação do Mitotano

Dados adicionais para a obtenção de parâmetros importantes para serem alimentados ao sistema Varicol são os seguintes: 1) queda de pressão máxima; 2) diâmetro das colunas; 3) comprimento das colunas; 4) solubilidade da alimentação; e, 5) Composição da alimentação. Esses dados estão mostrados na Figura 3.11 na forma de janela de tela do programa *Help*.

**Figura 3.11.** Outros dados de entrada para o cálculo das vazões projetadas para as correntes no sistema Varicol



#### d- Vazões das Correntes Projetadas para Uso no Varicol

As vazões calculadas pelo sistema computacional estão mostradas na Figura 3.12.

Figura 3.12. Vazões projetadas para as correntes no sistema Varicol.

The screenshot shows the 'Varicol parameters' section of the software. It includes input fields for various flow rates and a table for the number of columns per zone.

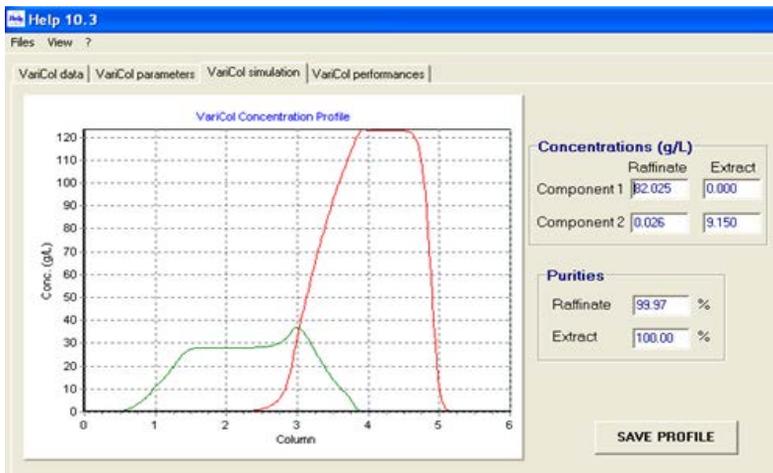
Varicol parameters		Number of column per zone	
Orec (mL/min)	14.39	Zone 1	0.98
Oext (mL/min)	7.08	Zone 2	2.41
Ofeed (mL/min)	0.48	Zone 3	1.32
Oreff (mL/min)	0.79	Zone 4	1.29
Period (min)	0.82	Total number of columns : 6.00	
Feed concentration (g/L)		Number of plates : 130 /column	
esp 1	135	<input type="button" value="Proposed flow rates"/> <input type="button" value="Process Calculation"/>	
esp 2	135		

Estimation of the solvent viscosity : 1.03mPa.s  
 Estimation of the solvent viscosity : 1.03mPa.s

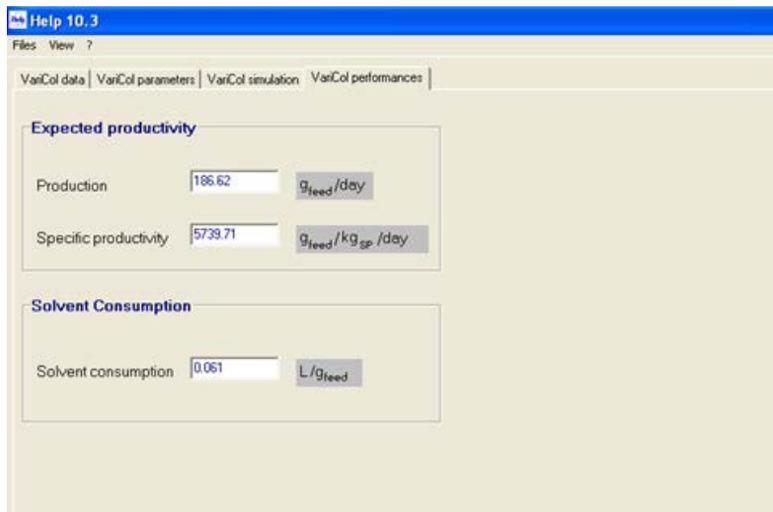
#### d- Perfis Internos Calculados para o Varicol

O software *Help* permite prever os perfis internos a serem obtidos no sistema experimental, as produtividades e o consumo de solvente teoricamente esperadas (Figuras 3.13 e 3.14).

Figura 3.13. Perfil interno de concentrações previsto teoricamente



**Figura 3.14.** Produção, produtividade e consumo de solvente calculados teoricamente pelo software Help



#### d- Resultados Finais para a Separação do Mitotano no Sistema Varicol

Os resultados finais da corrida experimental para a separação do mitotano na fase estacionária Tris 3,5-dimetilfenilcarbamato de amilose com 6 colunas e 1 cm e diâmetro e 10 cm e comprimento, concentração da alimentação de 50 g/mL e temperatura e 25 oC estão resumidos na Tabela 3.1:

**Tabela 3.1.** Tabela-resumo referente à pureza dos produtos e ao desempenho obtido durante a separação de mitotano no Varicol

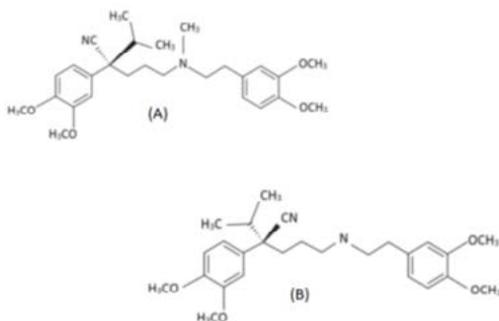
Nº de Ciclos	Pureza	
	Rafinado	Extrato
35	93,79	96,63
37	95,71	97,5

N° de Ciclos	Pureza	
	Rafinado	Extrato
44	96,4	97,56
55	97,4	96,7
60	97,7	97,3
66	98,13	91,245
<b>Desempenho</b>		
Consumo do solvente	61,0 L/kg enantiômero	
Produtividade S(-)mitotano	2,87 g refinado/g FEQ.dia	
Produtividade R(+)mitotano	2,87 g extrato/g FEQ.dia	

### 3.4.2 Separação dos Enantiômeros do Verapamil

O verapamil (2-(3,4-dimetoxifenil)-5-[2-(3,4-dimetoxifenil) etil-metil-amino]-2-propan-2-il-pentanonitrila) é um fármaco derivado sinteticamente da papaverina e que exibe potente e seletiva ação bloqueadora sobre os canais de cálcio do tipo L, atuando como agente eficaz no tratamento de doenças cardiovasculares, tais como: hipertensão, arritmias supraventriculares e angina pectoris de acordo com Singhal *et al.* (2012). Apresenta fórmula molecular  $C_{27}H_{38}N_2O_4$ , massa molar de 454,59 g/mol e encontra-se disponível como líquido oleoso e viscoso de coloração amarelo pálido. O fármaco caracteriza-se por ser um composto quiral comercializado e administrado como mistura racêmica dos enantiômeros S(-)-verapamil e R(+)-verapamil (Figura 3.15), os quais exibem propriedades farmacológicas distintas. O enantiômero S(-)-verapamil, de acordo com Mateus *et al.* (2007), apresenta maior potencial cardiovascular quando comparado ao seu antípoda óptico R(+)-verapamil e este, por sua vez, exibe ação antitumoral, atuando como inibidor hepatocarcinogênico segundo Yoshida *et al.* (2010).

**Figura 3.15.** Estrutura molecular dos enantiômeros do verapamil: (A) S-(-)-verapamil; (B) R-(+)verapamil.



A mistura racêmica do verapamil utilizada nesse estudo foi gentilmente doada pelas Indústrias Farmacêuticas EMS de Hortolândia, São Paulo, Brasil.

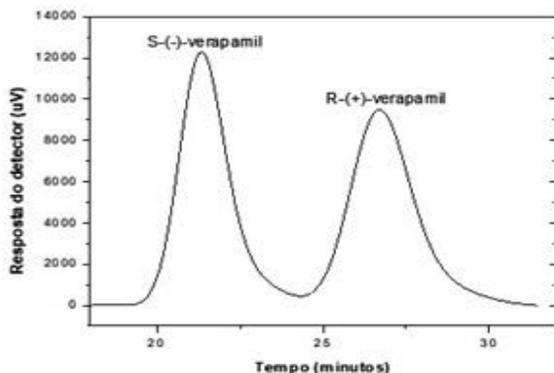
A fase estacionária utilizada é o tris 3,5-dimetilfenilcarbamato de amilose que possui o nome comercial de Chiralpak AD com diâmetro médio de partículas de 20  $\mu\text{m}$ . A coluna utilizada possui o comprimento de 10 cm e diâmetro interno de 10 mm. A fase móvel é formada por hexano, isopropanol, etanol e dietilamina na composição 90:5: 5:0,1 % (v/v/v/v), respectivamente, e selecionada com base em experimentos preliminares em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). Os experimentos foram todos realizados na temperatura e 25oC.

O perfil de eluição em fase diluída para uma coluna foi obtido com a concentração de 0,2 g/L, vazão de eluição de 1 mL/min, detecção UV em 270 nm e volume de injeção de 20  $\mu\text{L}$  e o perfil cromatográfico da separação mostrado na Figura 3.16.

Na separação quiral realizada na fase estacionária tris 3,5 dimetilfenilcarbamato de amilose, a ordem de eluição dos enantiômeros do verapamil já foi obtida por Mateus *et al.* (2007) indicando que a configuração S-(-)-verapamil é a menos retida enquanto que e R-(+)-verapamil é a mais retida.

Os parâmetros cromatográficos básicos obtidos para a separação em fase diluída na vazão de eluição de 1 mL/min e temperatura e 25 oC são mostrados na Tabela 3.2.

**Figura 3.16.** Perfil cromatográfico da separação, em fase diluída, do verapamil em tris 3,5 dimetilfenilcarbamato de amilose (Chiralpak AD) com fase móvel hexano: isopropanol: etanol: dietilamina 90: 5: 5: 0,1 % (v/v/v/v), respectivamente.

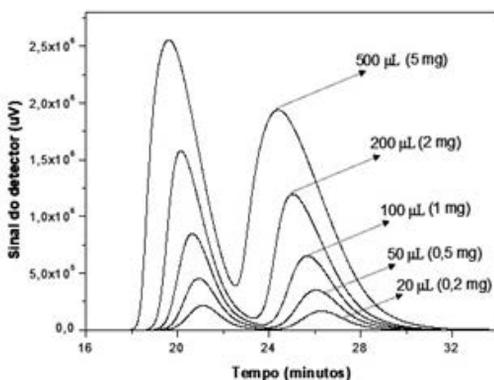


**Tabela 3.2.** Parâmetros cromatográficos obtidos durante a separação dos enantiômeros de verapamil em fase diluída

Parâmetros	Enantiômero	
	S-(-)-verapamil	R-(+)-verapamil
<i>Tempos de retenção (min)</i>	21,080	26,170
<i>Fator de retenção (k)</i>	2,984	3,984
<i>Número de pratos teóricos</i>	950	887
<i>Resolução (RS)</i>	1684	
<i>Fator de separação (α)</i>	1340	

O perfil de eluição em fase concentrada foi obtido com a concentração da solução de 10 g/L, vazão de eluição de 1 mL/min, detecção em UV a 260 nm e volumes de injeção de 20, 50, 100, 200 e 500  $\mu\text{L}$ . Os resultados para os perfis cromatográficos de soluções concentradas são mostrados na Figura 3.17.

**Figura 3.17.** Perfil de eluição para os enantiômeros de verapamil em fase concentrada (sobrecarga de injeção na coluna cromatográfica).



Do mesmo modo como apresentado no estudo de casos referente ao mitotano, aqui são apresentados os resultados obtidos pelo simulador HELP, para o verapamil. Tais resultados são de suma importância para a operação do leito móvel micro-Varicol e obtenção de resultados experimentais na separação quiral dos enantiômeros da molécula de verapamil. Esses resultados foram alimentados ao sistema obtido anteriormente.

Os dados da injeção analítica são mostrados na janela e tela o simulador HELP apresentada na Figura 3.18.

Figura 3.18. Dados de injeção analítica do verapamil no sistema Varicol.

The screenshot shows the 'HELP 10.3' software interface with the following parameters:

Section	Parameter	Value
Column parameters	Column diameter (cm)	1
	Column length (cm)	10
	Bed density (kg/L)	0.65
	Particle size (µm)	30
Analytical injection	Flowrate (mL/min)	1
	Retention time 1 (min)	21.000
	Retention time 2 (min)	25.170

As isotermas de adsorção são calculadas pelo simulador HELP e apresentados como uma janela de tela na Figura 3.19.

Figura 3.19. Isotermas de adsorção calculadas para o verapamil

The screenshot shows the 'HELP 10.3' software interface with the following data:

**Overloaded injections**

	Q (mL/min)	Vinj (µL)	C1 (g/L)	C2 (g/L)	tr1 (min)	tr2 (min)
inj 1	1	20	5	5	20.45833	25.45833
inj 2	1	50	5	5	20.31667	25.21667
inj 3	1	100	5	5	20.0000	24.80000
inj 4	1	200	5	5	19.55000	24.21667
inj 5	1	500	5	5	18.61667	23.05833
inj 6						

**Isotherms parameters**

$$\bar{C}_1 = \lambda C_1 + \frac{NK_1 C_1}{1 + K_1 C_1 + K_2 C_2}$$

	$\lambda$	$NK_1$	$N$
Esp1	2.5	1.3866	19
Esp2	2.5	2.3868	19

Buttons: CALCULATE, VERIFY

A determinação dos parâmetros da isoterma de adsorção dos enantiômeros S-(-)-verapamil e R-(+)-verapamil foi realizada com os dados experimentais do perfil de eluição em fase concentrada (Figura 3.17). Foram tomados como “dados de entrada” os valores de  $t_{r1}$  e  $t_{r2}$ , correspondentes aos tempos (em minutos), obtidos como ponto de máximo quando se aplicou o método da primeira derivada em cada um dos perfis de eluição.

O Modelo de Langmuir competitivo foi utilizado para ajustar os dados das isotermas de acordo com as Equações 3.7 e 3.8:

$$q_1 = \lambda_1 C_1 + \frac{\beta \psi_1 C_1}{1 + \psi_1 C_1 + \psi_2 C_2} \rightarrow \text{S-(-)-verapamil} \quad (3.7)$$

$$q_2 = \lambda_2 C_2 + \frac{\beta \psi_2 C_2}{1 + \psi_1 C_1 + \psi_2 C_2} \rightarrow \text{R-(+)-verapamil} \quad (3.8)$$

onde  $\lambda$ ,  $\beta$  e  $\psi_i$  são os parâmetros ajustáveis da isoterma,  $q_1$  e  $q_2$  as quantidades adsorvidas para os componentes 1 e 2 e  $C_1$  e  $C_2$  as concentrações na fase líquida dos componentes 1 e 2.

**Tabela 3.3.** Valores numéricos dos parâmetros das isotermas de adsorção.

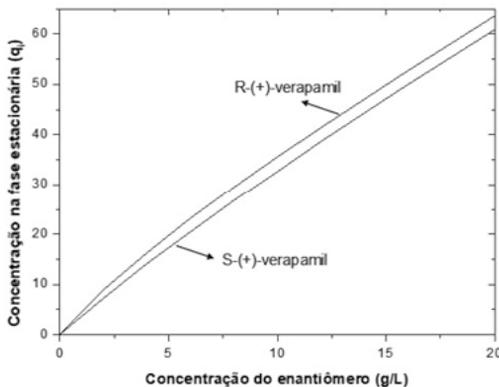
Enantiômero	Parâmetros das isotermas de adsorção			
	$\lambda$	$\beta\psi_i$	$\beta$	$\psi_i$
<i>S-(-)-verapamil</i>	2,5	1,3066	19	0,06877
<i>R-(+)-verapamil</i>	2,5	2,3868	19	0,12562

$$q_1 = 2,5.C_1 + \frac{1,3066.C_1}{1 + 0,06877.C_1 + 0,12562.C_2} \quad (3.9)$$

$$q_2 = 2,5.C_2 + \frac{2,3868.C_2}{1 + 0,06877.C_1 + 0,12562.C_2} \quad (3.10)$$

A representação gráfica para as equações acima mencionadas é apresentada na Figura 3.20.

**Figura 3.20.** Isotermas de adsorção dos enantiômeros S-(-)-verapamil e R-(+)-verapamil na fase estacionária Chiralpak AD a 25 °C.



A partir das Equações 3.2 a 3.6 foram calculadas as quedas e pressões e altura equivalente a um prato teórico, de acordo com a tela o simulador HELP mostrada na Figura 3.21.

**Figura 3.21.** Dados da hidrodinâmica do sistema Varicol para o verapamil

The screenshot shows the 'Hydro' software interface with the following data and calculations:

**Column efficiency**

Flowrate (mL/min): 1 / 2

Number of plates: 915 / 474

**CALCULATE** **VIEW**

HETP (cm) = 0.4 / dp (cm) = 0.47915 u (cm/sec)

**Pressure drop**

Flowrate (mL/min): 4

Pressure (bar): 20

**CALCULATE**  $\Delta P$  (bar/cm) = 1.99422 u (cm/sec)

Os dados básicos referentes à alimentação estão mostrados na Figura 3.22.

**Figura 3.22.** Dados referentes à alimentação do verapamil no sistema Varicol

The screenshot shows the 'Varicol' software interface with the following data:

**Varicol data**

Maximal pressure (bar): 30

Column diameter (cm): 1.0

Column length (cm): 10

**Feed data**

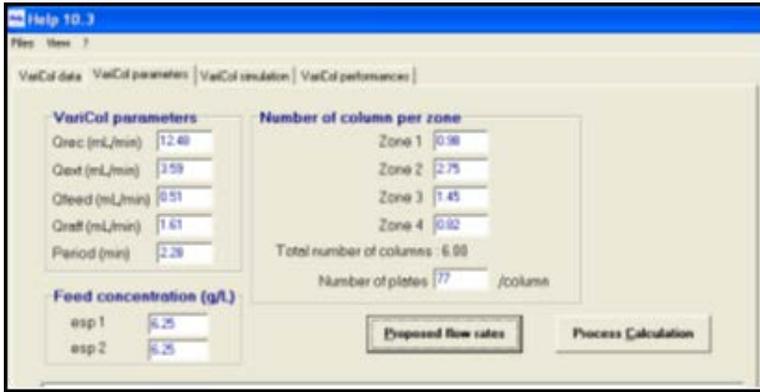
Feed solubility (g/L): 110

% Component 1: 50

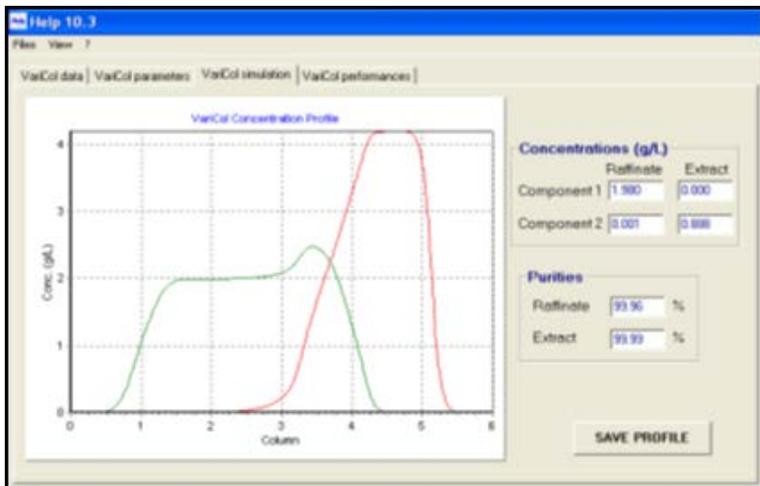
**Pulse injection**

Data available

As vazões iniciais de alimentação ao sistema Varicol-micro e número e colunas por zona são mostrados na Figura 3.23.

**Figura 3.23.** Vazões iniciais de soluções de verapamil alimentadas ao Varicol

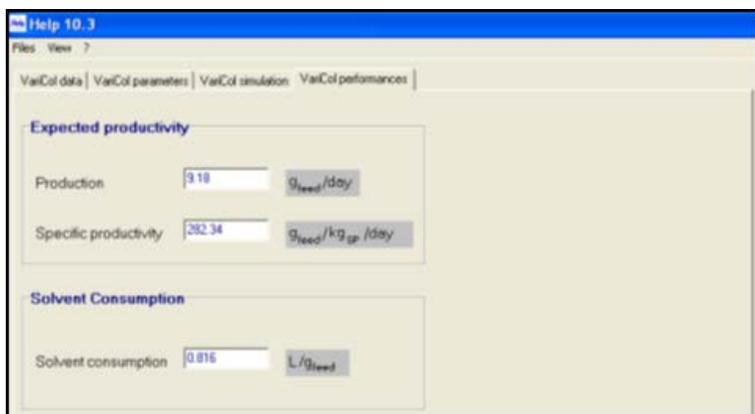
Os perfis internos obtidos no sistema Varicol-micro para o verapamil são mostrados na Figura 3.24.

**Figura 3.24.** Perfis de concentração do verapamil calculados para o sistema Varicol

Conforme especificado, as purezas obtidas pelo simulador HELP correspondem à 99,96 % para o refinado (S-(-)-verapamil) e à 99,99 % para o extrato (R-(+)-verapamil).

Os parâmetros principais de desempenho na separação o verapamil estão mostrados na Figura 3.25.

**Figura 3.25.** Parâmetros de desempenho para o verapamil calculados pelo sistema Varicol



Com a utilização de 6 colunas Chiralpak AD (100 x 10 mm x 20 µm) em série e concentração da alimentação de 12,5 g/L de verapamil, foram retiradas no decorrer da corrida experimental amostras das correntes de refinado e extrato para o monitoramento instantâneo de pureza em ciclos específicos.

As purezas foram obtidas em sistema CLAE utilizando-se uma coluna analítica com a fase estacionária AmyCoat (Cromais®) com nome científico Tris 3,5 dimetilfenilcarbamato de amilose, comprimento da coluna de 25 cm, diâmetro interno da coluna de 4,6 mm e diâmetro de partícula de 10 µm.

Para a determinação das purezas foi utilizada a fase móvel hexano: isopropanol: etanol:dietilamina na composição: 90:5:5:0,1 % (v/v/v/v),

respectivamente. A vazão utilizada no CLAE é de 1 mL/min, a temperatura de 25 °C, detecção em UV a 270 nm e volume de injeção de 20 µL.

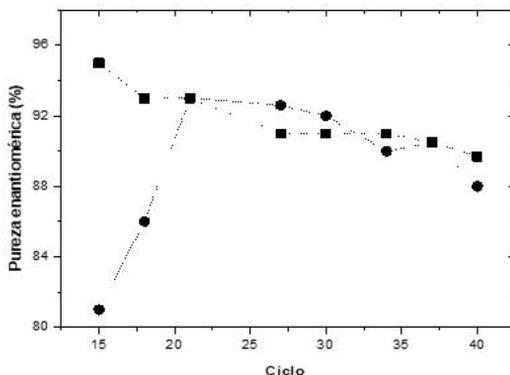
A Tabela 3.4 e a Figura 3.26 mostram o conjunto de purezas obtidas em ciclos específicos no sistema Varicol para o verapamil no extrato e refinado.

Finalmente, foram obtidos valores de purezas globais iguais a 88,5 % e 92,5 % para o extrato (R-(+)-verapamil) e refinado (S-(-)-verapamil), respectivamente. A pureza global refere-se às amostras coletadas ao longo de todos os ciclos ocorridos durante a corrida experimental com o leito móvel Varicol. Os valores de pureza foram determinados através dos cromatogramas representados pelas Figuras 3.27 e 3.28, através da divisão entre as respectivas áreas dos picos cromatográficos referentes a cada enantiômeros.

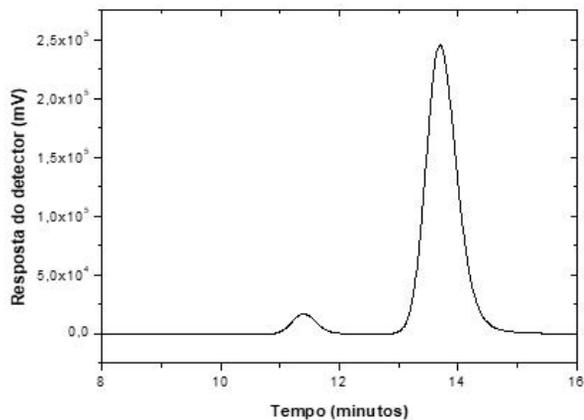
**Tabela 3.4.** Purezas obtidas em ciclos específicos da corrida experimental

Número de Ciclos	Pureza (%)	
	Refinado	Extrato
15	95,0	81,0
18	93,0	86,0
21	93,0	93,0
27	91,0	92,6
30	91,0	92,0
34	91,0	90,0
37	90,5	90,5
40	89,7	88,0

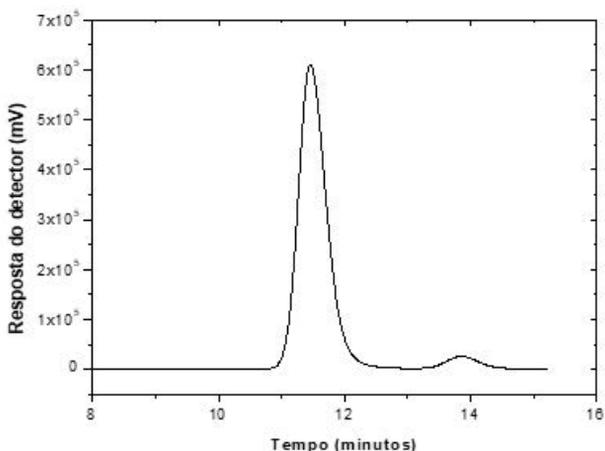
**Figura 3.26.** Pureza dos enantiômeros obtida em função do número de ciclos da corrida experimental no leito móvel Varicol. (●) Extrato/ R-(+)-verapamil; (■) Refinado/ S-(-)-verapamil.



**Figura 3.27.** Cromatograma obtido por HPLC analítico para obtenção da pureza do extrato.



**Figura 3.28.** Cromatograma obtido por HPLC para análise de pureza do refinado.



As Tabelas 3.5 e 3.6, a seguir, apresentam os principais parâmetros experimentais obtidos na separação do verapamil, contendo os dados finais fundamentais para a separação por cromatografia contínua em seis colunas simultâneas, conectadas em série, do sistema Varicol utilizando a fase estacionária tris  $-(3,5\text{-dimetilfenilcarbamato})$  de amilose e a fase móvel hexano: isopropanol: etanol: dietilamina 90: 5: 5: 0,1 % (v/v/v/v).

**Tabela 3.5.** Tabela dos parâmetros operacionais da separação do verapamil no Varicol

Parâmetros Operacionais	
Coluna	Tris $-(3,5\text{-dimetilfenilcarbamato})$ de amilose
Fase móvel	Hexano: isopropanol: etanol: dietilamina 90: 5: 5: 0,1 % (v/v/v/v).
Número de colunas	6 (cada uma com 6 gramas de Fase estacionária quiral.
Comprimento da coluna	100 mm

<b>Parâmetros Operacionais</b>	
Diâmetro interno da coluna	10 mm
Concentração de alimentação	12,5 g/L
Vazão de alimentação	0,51 mL/min
Vazão de eluente	4,69 mL/min
Temperatura	25 °C
Pressão	30 bar

**Tabela 3.6.** Tabela referente ao desempenho obtido durante a separação de verapamil no Varicol

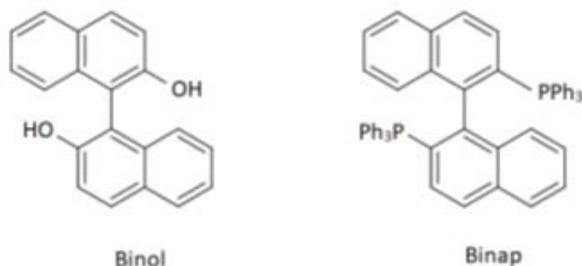
<b>Desempenho</b>	
Pureza do enantiômero do S(-)	92,5 %
Excesso enantiomérico do S(-)	85,0 %
Pureza do enantiômero R(+)	88,5 %
Excesso enantiomérico do R(+)	77 %
Consumo do solvente	81,6 L/kg enantiômero
Produtividade S(-)verapamil	0,14 g refinado/g FEQ.dia
Produtividade R(+) verapamil	0,14 g extrato/g FEQ.dia

É válido ressaltar que os dados aqui apresentados constituem no primeiro conjunto completo de resultados em escala mundial decorrentes do uso da cromatografia contínua no modo Varicol para a separação da molécula do fármaco verapamil.

### 3.4.3 Separação dos Enântiômeros do Binol

O binol (Figura 3.29) é um arcabouço muito valioso para confecção de ligantes úteis em catálise assimétrica. O derivado mais conhecido é o BINAP (Figura 3.29) utilizado em hidrogenações assimétricas catalíticas (Shimizu *et al.*, 2005)

**Figura 3.29.** Estrutura química das moléculas de Binol e Binap, respectivamente.

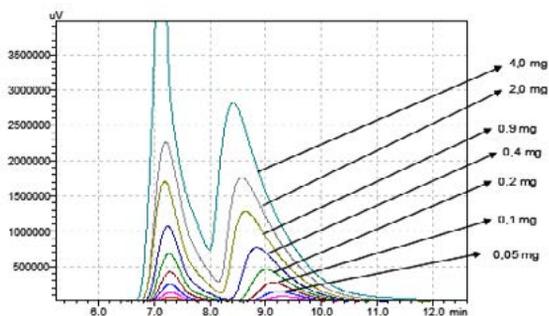


O binol racêmico utilizado nesse estudo foi obtido pelo Laboratório de Sínteses Orgânicas do Instituto de Química da Unicamp.

A fase estacionária utilizada é o tris 3,5 dimetilfenilcarbamato de amilose que possui o nome comercial de Chiralpak AD com diâmetro médio de partículas de 20  $\mu\text{m}$ . A coluna utilizada possui o comprimento de 10 cm e diâmetro interno de 10 mm. A fase móvel é formada por 100% metanol e selecionada com base em experimentos preliminares em HPLC. Os experimentos foram todos realizados na temperatura de 25°C.

Os perfis de eluição do binol para várias concentrações desde a fase diluída até a concentrações mais elevadas são mostrados na Figura 3.30. Para esses dados são utilizadas vazão de eluição de 1 mL/min, detecção UV em 270 nm e volume de injeção de 20  $\mu\text{L}$ .

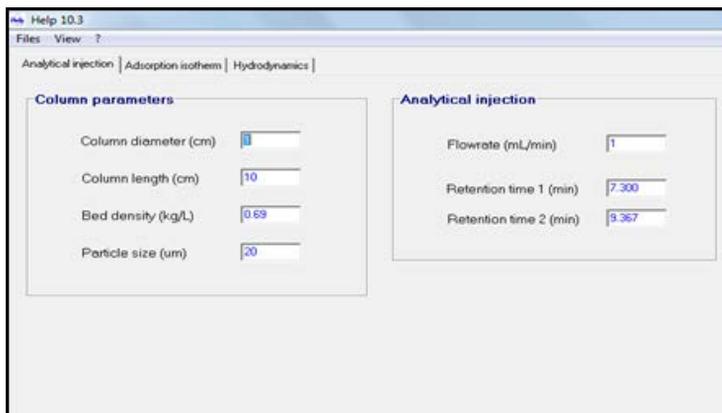
**Figura 3.30.** Perfil de eluição para os enantiômeros do binol em fase diluída e concentrada.



Do mesmo modo estudados nos casos anteriormente descritos e referente ao mitotano e verapamil, aqui são apresentados a seguir os resultados obtidos pelo simulador HELP® 10.3, para o caso da separação do binol. Tais resultados são de muita importância para a operação do leito móvel micro-Varicol e obtenção de resultados experimentais na separação quiral dos enantiômeros. Para a obtenção desses dados foram alimentados ao sistema os dados obtidos no item 3.3.2.

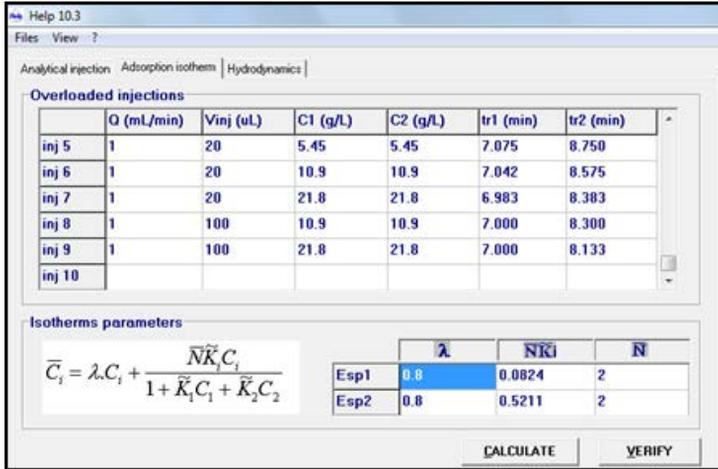
Os dados para injeção com soluções diluídas o binol são mostrados na Figura 3.31.

**Figura 3.31.** Dados de injeção analítica do binol no sistema Varicol



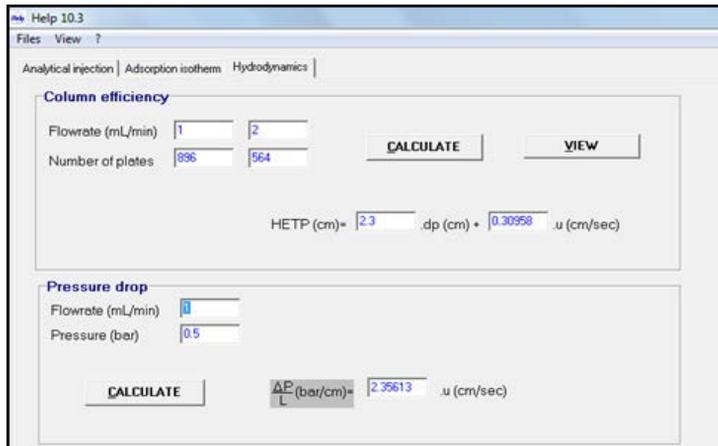
As isotermas de adsorção o binol a 25oC na fase estacionária Chiralpak estão mostrados na Figura 3.32.

Figura 3.32. Isotermas de adsorção calculadas para o binol.



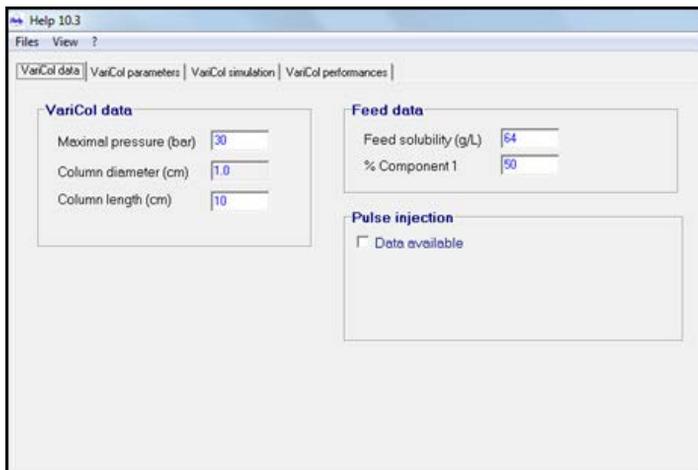
Os dados principais de queda de pressão e altura dos pratos teóricos da coluna estão mostrados na Figura 3.33.

Figura 3.33. Dados da hidrodinâmica do sistema Varicol para o binol.



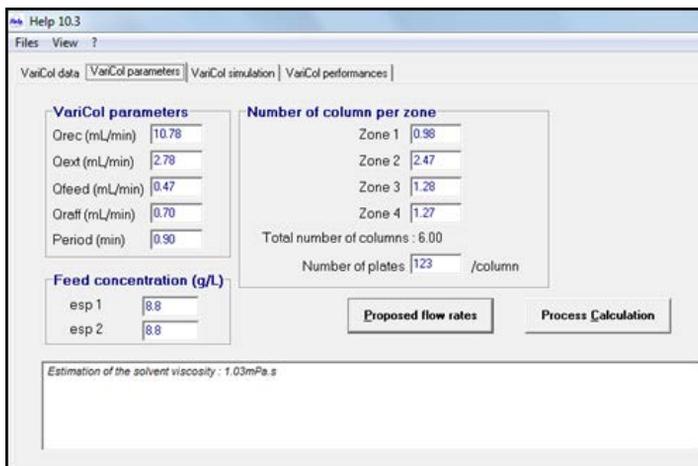
Os dados referentes à alimentação das soluções de binol estão apresentados na Figura 3.34.

**Figura 3.34.** Dados referentes à alimentação do binol no sistema Varicol.



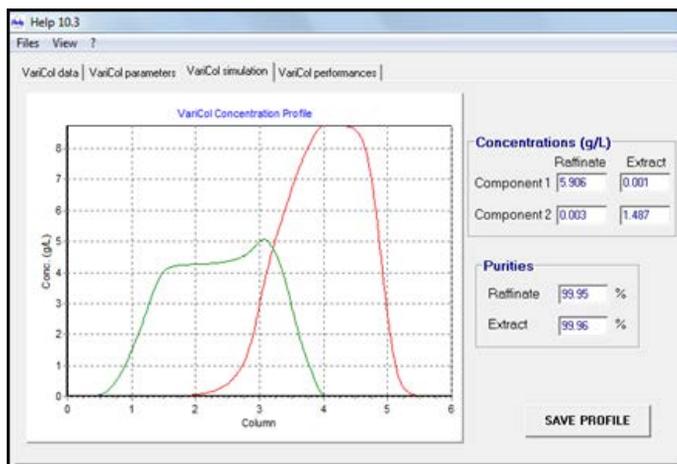
Os parâmetros básicos para o processamento no sistema Varicol estão apresentados na Figura 3.35.

**Figura 3.35.** Vazões iniciais e soluções de binol alimentadas ao Varicol.



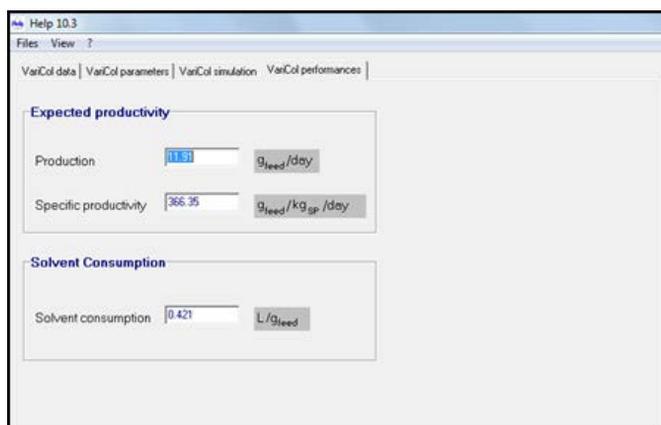
O perfil de concentrações simulado para o sistema binol-Varicol está na Figura 3.36.

**Figura 3.36.** Perfis de concentração do binol calculados para o sistema Varicol



Os parâmetros principais de desempenho do sistema Varicol para a separação o binol estão mostrados na Figura 3.37.

**Figura 3.37.** Parâmetros de desempenho para o binol calculados pelo sistema Varicol



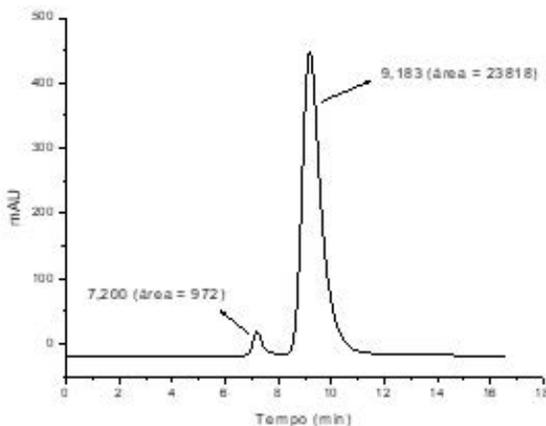
Com a utilização de 6 colunas Chiralpak AD (100 x 10 mm, 20  $\mu\text{m}$ ) em série e concentração da alimentação de 3,3 g/L de binol racêmico foram retiradas no decorrer da corrida experimental amostras das correntes de refinado e extrato para o monitoramento instantâneo de pureza em ciclos específicos.

As purezas foram obtidas por meio de análise de concentração utilizando CLAE utilizando-se uma coluna analítica com a fase estacionária AmyCoat (Kromasil®) com nome científico Tris 3,5 dimetilfenilcarbamato de amilose, comprimento da coluna de 25 cm, diâmetro interno da coluna de 4,6 mm e diâmetro de partícula de 10  $\mu\text{m}$ .

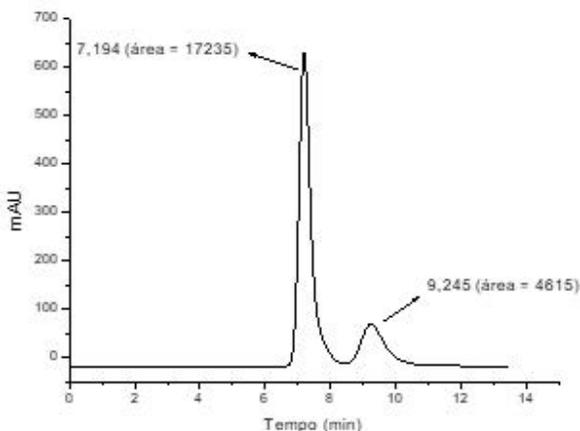
Para a determinação das purezas foi utilizada a fase móvel formada por metanol 100%. A vazão utilizada no HPLC é de 1 mL/min, a temperatura de 25 oC, detecção em UV à 270 nm e volume de injeção de 20  $\mu\text{L}$ .

As purezas obtidas para o extrato e o refinado estão mostradas nas Figuras 3.38 e 3.39.

**Figura 3.38.** Cromatograma obtido por HPLC para análise de pureza do extrato (Pureza = 96%; excesso enantiomérico = 92%).



**Figura 3.39.** Cromatograma obtido por HPLC para análise de pureza do refinado (Pureza = 79%; excesso enantiomérico = 58 %).



Considerando-se a pureza obtida pela análise dos cromatogramas do extrato e do refinado em conjunto com os perfis de UV e polarímetro obtidos nos ciclos indicados acima, pode-se perceber um “vazamento” do extrato na zona I para a zona IV. O lado direito dos perfis apresenta uma elevação no sinal de absorbância do UV, indicação clara de um ajuste incorreto do número de colunas por zona e das vazões iniciais.

Apesar da simulação realizada no programa HELP indicar altas purezas para ambos os enantiômeros, deve-se considerar que o conjunto de parâmetros obtido constitui as condições de contorno do sistema utilizadas pelo controle automático (ACS) para tentar ajustar as vazões no decorrer da purificação. De forma alguma existe a garantia de que estas vazões iniciais sejam as corretas quando se utilizam soluções mais diluídas, como é o caso. Em nossa abordagem, foi empregada uma solução de concentração 3,3g/L (1g de material em 300 mL de solvente), pois esta é a concentração-limite mínima que se encaixa nas necessidades de um laboratório de síntese orgânica.

As Tabelas 3.7 e 3.8 apresentam, resumidamente, os principais parâmetros experimentais obtidos na separação binol, contendo os dados finais fundamentais para a separação por cromatografia contínua

em seis colunas simultâneas, conectadas em série, do sistema Varicol utilizando a fase estacionária tris -(3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose e a fase metanol 100%.

**Tabela 3.7.** Resumo dos parâmetros operacionais da separação do binol.

Parâmetros Operacionais	
Coluna	Tris -( 3,5-dimetilfenilcarbamato) de amilose
Fase móvel	Metanol, 100 %
Número de colunas	6
Comprimento da coluna	100 mm
Diâmetro interno da coluna	10 mm
Concentração de alimentação	3,3 g/L
Vazão de alimentação	0,47
Vazão de eluente	3,02
Temperatura	25 °C
Pressão	30 bar

**Tabela 3.8.** Resumo referente ao desempenho obtido durante a separação do binol.

Desempenho	
Pureza do enantiômero do S(-)	96%
Excesso enantiomérico do S(-)	92%
Pureza do enantiômero R(+)	79%

Desempenho	
Excesso enantiomérico do R(+)	58%
Consumo do solvente	421 L/kg enantiômero
Produtividade S(-)binol	0,035 (kg extrato/kg FEQ.dia)
Produtividade R(+)-binol	0,028 (kg refinato/kg FEQ.dia)

Devido à baixa solubilidade do binol no solvente otimizado para a separação cromatográfica (64 g/L), verifica-se que as produtividades dos enantiômeros, na faixa de 28 g/L a 35 g/L, se apresentam com valores considerados baixos quando comparados com a separação de outros enantiômeros.

### 3.5 CONCLUSÕES

Foi demonstrada a eficiência do conceito Varicol de separação contínua para três diferentes misturas racêmicas de fármacos. Os resultados mostraram que os enantiômeros dos fármacos mitotano, verapamil e binol foram satisfatoriamente separados em coluna Chiralpak AD na escala semi-preparativa de gramas/dia. A separação ocorreu praticamente até a linha de base para os três compostos. Os parâmetros cromatográficos obtidos (fatores de retenção, seletividade e resolução) enquadraram-se nas faixas de valores reportados na literatura que classificam a separação como completa. Foram obtidos dados importantes de processamento como a produtividade por massa de adsorvente e o consumo e solvente nas separações.



# LEITURA COMPLEMENTAR

O leitor interessado numa revisão dos conceitos básicos sobre o tema aqui proposto, para a correta compreensão dos princípios que fundamentam os procedimentos sugere-se a leitura das seguintes publicações:

Chankvetaze, B., Ed., **Chiral Separations**. Elsevier, Amsterdam, 2001, p. 489.

Ludemann-Hombourger, O., Nicoud, O.R.M., Bailly, M., **The “VARICOL” process: A new multicolumn continuous chromatographic process**. Separation Science and Technology. 35: 1829-1862, 2000.

Zhang, Z., Hidajat, K., Ray, A.K., Morbidelli, M., **Multiobjective optimization of SMB and Varicol process for chiral separation**. AIChE J. 48: 2800-2810, 2002.

## REFERÊNCIAS

Adam, P., Nicoud, R.M., Bailly, M. O. Ludemann-Hombourger, O., U. S. Pat. 6,136, 198, 2000.

Bird, R.B., Stewart, W. E., Lightfoot, E.N., **Fenômenos de Transporte**, Tradução da Segunda Edição, LTC Livros Técnicos e científicos Editoras S.A., Rio de Janeiro, 2004, p.897.

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.

Mateus, F.H., Lepera, J.S., Marques, M.P., Boralli, V.B., Lanchote, V.L. Simultaneous analysis of the enantiomers of verapamil and norverapamil in rat plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. 45: 762-768, 2007.

Massarani, G., **Fluidodinâmica em Sistemas Particulados**, Editora da UFRJ, Rio de Janeiro, 1997, p.189.

Nicoud, R.M., Seidel-Morgenstern, A. **Adsorption isotherms: experimental determination and application to preparative chromatography**. Isolation and Purification. 2: 165-200, 1996.

Pais, L.S., Rodrigues, A. E. Modeling strategies for enantiomers separations by SMB chromatography. **AIChE Journal**. 44: 561-569, 1998.

Shimizu, H., Nagasaki, I., Saito, T. Recent advances in biaryl-type bisphosphine ligands. **Tetrahedron**. 61: 5405-5432, 2005.

Singhal, P., Yadav, M., Winter, S., Guttikar, S., Patel, D., Mills, M., Shrivastav, P.S. Enantiomeric separation of verapamil and its active

metabolite, norverapamil, and simultaneous quantification in human plasma by LC-ESI-MS-MS. **Journal of Chromatographic Science**. 50 :839-848, 2012.

Yoshida, M.I., Gomes, E.C.L., Soares, C.D.V., Cunha, A.F., Oliveira, M.A. Thermal analysis applied to verapamil hydrochloride characterization in pharmaceutical formulations. **Molecules**. 15 :2439-2452, 2010.

# 4

## Separação dos enantiômeros do praziquantel utilizando leite móvel simulado em escala semi-preparativa

Felipe Coelho Cunha<sup>1,2</sup>

Amaro Gomes Barreto Jr.<sup>1</sup>

Maurício Bezerra Souza Jr.<sup>1,2</sup>

Argimiro Resende Secchi<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Engenharia de Processos Químicos e Bioquímicos (EPQB), Escola de Química/UFRJ, Rio de Janeiro – RJ, Brasil

<sup>2</sup> Programa de Engenharia Química (PEQ), COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro – RJ, Brasil



# RESUMO

O foco deste capítulo é a investigação do processo de separação por cromatografia contínua conhecido como Leito Móvel Simulado (LMS) para a separação da mistura racêmica de praziquantel (PZQ), utilizada no combate à esquistossomose. A unidade de LMS projetada e construída foi validada e o seu desempenho foi comparado com os encontrados na literatura para a separação do racemato de praziquantel. O desempenho da unidade construída foi superior aos encontrados na literatura, mesmo com a concentração de alimentação de praziquantel, aproximadamente, 10 vezes inferior aos previamente utilizado por outros autores. Dentre os experimentos realizados na unidade, o que utilizou maior concentração de alimentação permitiu à unidade operar na região não-linear da isoterma. Além disso, a atual unidade foi capaz de atingir o estado estacionário cíclico mais rapidamente.

## 4.1 INTRODUÇÃO

Praziquantel (PZQ) é um anti-helmíntico contra um grande espectro de parasitas trematóides e cestóides (Reich *et al.*, 1998). Graças a esta característica particular, a substância inclusa na lista de remédios essenciais organizada pelo OMS (WHO, 2021). A administração é oral (i.e., forma de comprimidos). Infelizmente, esses comprimidos não incluem todos os grupos de seres humanos no tratamento. Crianças em idade pré-escolar (abaixo de 5 anos) não são capazes de engolir esses comprimidos, o que leva a grandes chances de descontinuidade no tratamento por parte dessas crianças. Atualmente, somente crianças acima de 6 anos de idade tem tratamento regular (Bustinduy *et al.*, 2017). Além disso, Bustinduy *et al.* (2016) afirmam que doses ainda maiores de PZQ são necessárias para o tratamento de crianças em idade pré-escolar (> 60 mg/kg), enquanto em adultos as doses adequadas são aproximadamente 40 mg/kg. Os comprimidos regulares contêm a mistura racêmica (The pediatric formulation, 2021), no qual o composto levo-praziquantel (L-PZQ) é o princípio ativo, e o dextro-praziquantel (D-PZQ), além de não servir de princípio ativo, confere forte gosto amargo (Meyer *et al.*, 2009). Portanto, somente metade do comprimido tem o efeito esquistomicida desejado e a elevada quantidade do composto D-PZQ não permite que o comprimido seja mastigável. Com o intuito de solucionar este problema, pesquisadores, que fazem parte de uma cooperação público-privada internacional, estão desenvolvendo um comprimido sublingual rico em L-PZQ, permitindo assim que o comprimido tenha um quarto do tamanho do comprimido comercialmente disponível e menor amargor. Outros estudos com o racemato também estão em desenvolvimento, como por exemplo o encapsulamento do PZQ racêmico (Malhado *et al.*, 2016; Paiva *et al.*, 2019). Apesar da problemática em torno das crianças em idade pré-escolar, outros estudos relevantes com o PZQ são: resistência dos esquistossomos em relação ao princípio ativo (L-PZQ) (Doenhoff *et al.*, 2009; Melman *et al.*, 2009; Doenhoff *et al.*, 2009) e síntese de derivados do PZQ (Giglielmo *et al.*, 2014; Dong *et al.*, 2010; Duan *et al.*, 2012), modificações do PZQ com o objetivo de matar esquistossomos jovens

(Zheng *et al.*, 2014). Além dos estudos com o L-PZQ, os experimentos de racemização também são importantes e demandam o fornecimento de D-PZQ puro. Outros estudos importantes são a determinação do mecanismo de ação do L-PZQ sobre o parasita (Doenhoff *et al.*, 2002; Melman *et al.*, 2009; Zheng *et al.*, 2014). Portanto, ter à disposição os enantiômeros puros é fundamental para que os estudos acima possam acontecer, lembrando que não há disponibilidade no mercado de enantiômeros do PZQ puros. Há uma lacuna na obtenção desses enantiômeros puros, pois a separação é cara, devido à ineficiência na separação. A separação via cromatografia contínua em contracorrente é uma solução viável, que será abordada neste capítulo através do Leito Móvel Simulado (LMS).

### 4.1.1 Separação do Praziquantel Utilizando o Conceito de LMS

Em 1993, Ching *et al.* (1993) foram os primeiros a utilizar o LMS para separar a mistura racêmica do praziquantel em escala semi-preparativa. Algumas particularidades da unidade foram: (1) utilização de triacetato de celulose microcristalino (do inglês, *Microcrystalline Cellulose TriAcetate* – MCTA), (2) o processo cromatográfico foi composto por 4 colunas cromatográficas, (3) a concentração de alimentação de 50 gL<sup>-1</sup> de mistura racêmica de praziquantel em metanol, (4) metanol foi utilizado com dessorvente e (5) o LMS não reciclou o dessorvente (i.e., ausência da zona 4). A configuração das colunas cromatográficas em cada zona foi 1:1:2 (zona 1: zona 2: zona 3). Com o LMS, nesta configuração, foi possível atingir 90,1% de D-PZQ na corrente de extrato e 93,7% de L-PZQ na corrente de refinado. Lim *et al.* (1995) utilizaram uma configuração de LMS similar ao trabalho anterior, porém utilizando 8 colunas cromatográficas e a disposição delas no processo foi 1:4:3. A corrente do refinado apresentou 97,5% de pureza de L-PZQ. Com o intuito de obter 100% de pureza de L-PZQ, o processo de cristalização foi acoplado logo após a corrente de refinado do LMS. Os trabalhos acima citados utilizaram uma fase estacionária pouco estável, por não ser recoberta em uma fase inerte, e não regeneraram o solvente ao não incluir a zona 4 na configuração da

unidade de LMS utilizada, soma-se ainda a utilização de um solvente que possui menor solubilidade de PZQ, se comparado ao utilizado no trabalho neste capítulo.

Em nosso Grupo de Pesquisa, Andrade *et al.* (2016) realizaram um estudo computacional adotando a estratégia de controle conhecida como Controle por Predição com Modelos Não-Lineares (do inglês, *Nonlinear Model Predictive Control* - NMPC) para a separação de racemato de PZQ utilizando LMS. O desempenho dos controladores foi testado em diferentes situações (i.e., mau funcionamento das bombas e válvulas e *set-point tracking*). O controlador mostrou respostas rápidas e suaves, mesmo quando foi incluída uma discrepância entre os parâmetros da planta e do modelo. Pela primeira vez um modelo assim constituído foi satisfatoriamente utilizado. Outro aspecto importante é a presença da zona 4 que evidencia o reciclo do solvente, o que melhora o desempenho do processo. A unidade real de LMS construída em nosso laboratório tem viabilizado novos estudos para melhor entender a sua dinâmica e, conseqüentemente, promover atualizações nos modelos matemáticos para o aprimoramento de estratégias de controle baseadas em modelos.

## 4.1.2 Fases Estacionárias Baseadas em Polissacarídeo

Muitos trabalhos encontrados na literatura na década de 1990 utilizaram a MCTA, uma fase estacionária quirál (*Chiral Stationary Phase* - CSP) baseada em polissacarídeos, para a separação de misturas de PZQ (Lim *et al.*, 1995; Lim e Ching, 1996a; Lim e Ching, 1996b). Ela se tornou comum devido à sua alta capacidade de carga e boa enantio-seletividade. Entretanto, a inexistência de material de suporte não permite a esta CSP ter boa estabilidade mecânica (Lammerhofer e Lindner, 2000). Com o intuito de superar este problema, os adsorventes modernos passaram a ser depositados em superfícies de partículas macroporosas de sílica (Lammerhofer e Lindner, 2000). Atualmente, as novas fases estacionárias em sua maioria ainda são à base de polissacarídeo (Chankvetadze *et al.*, 1993; Chankvetadze *et al.*, 1995). A principal ideia envolvida no desenvolvimento de novas fases estacionárias nas últimas

três décadas foi basicamente mudar os substituintes no anel aromático do grupo fenil dos polissacarídeos (Chankvetadze *et al.*, 2012). Graças a isso, a fase estacionária tris(3-cloro 4-metil fenil carbamato) celulose (comercialmente conhecida como Chiralcel™ OZ) tem uma alta capacidade de reconhecimento quiral e, ao mesmo tempo, baixa polaridade em solventes polares usualmente utilizados em separação cromatográfica (e.g., etanol). Outro aspecto é que o PZQ é altamente solúvel em etanol (uma característica importante quando se trabalha em escala preparativa).

## 4.2 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.2.1 Material

O solvente utilizado foi o etanol grau HPLC fornecido pela Tedia (Brasil). Os solutos utilizados foram 1,3,5-tri-*tert*-butylbenzene (TTBB) 97% fornecido pela Sigma-Aldrich (USA) e a mistura racêmica sólida de PZQ, gentilmente cedida por LASiFA – Farmanguinhos/Fiocruz (Brasil).

### 4.2.2 Metodologia Experimental

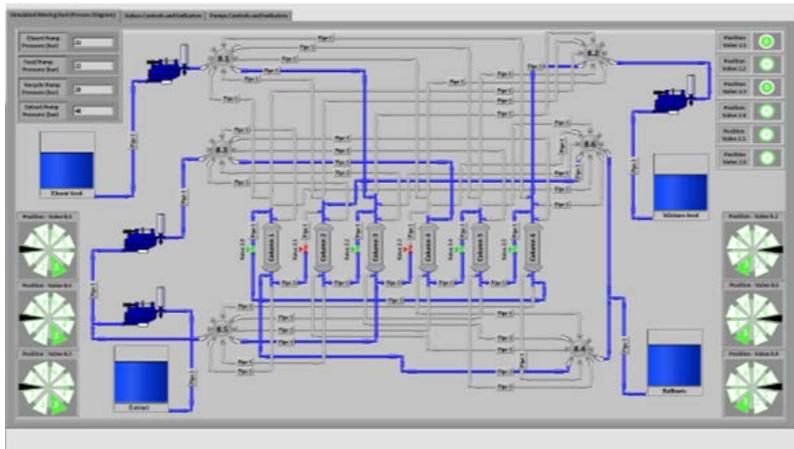
#### a- Caracterização da Coluna Cromatográfica

**Porosidade:** Um volume de 20  $\mu\text{L}$  de solução de 2g/L de TTBB em etanol foi injetado no HPLC (todos os equipamentos da marca JASCO). A temperatura do forno foi fixada em 25°C e o comprimento de onda do detector de UV/vis foi fixado em 210 nm. A injeção foi repetida para sete vazões diferentes (0,5; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0 e 6,0 mL/min). Para cada vazão, os experimentos foram repetidos três vezes. Uma regressão não-linear utilizando os tempos de retenção em cada injeção vs. vazão volumétrica foi realizada para cada coluna cromatográfica. A porosidade total média foi calculada entre as seis colunas caracterizadas (Henner, 2012).

**Constantes de Henry:** O procedimento experimental foi similar ao utilizado para medir a porosidade total, porém com solução de 1 g/L de mistura racêmica. As constantes de Henry média foram calculadas entre as seis colunas cromatográficas Henner, 2012).

**Unidade de LMS:** A unidade de cromatografia construída foi colocada em uma sala climatizada, com o intuito de propiciar uma condição a mais próxima possível de uma condição isotérmica. A disposição de cada coluna em cada zona foi 1:2:2:1 (zona 1: zona 2: zona 3: zona 4). Existem 4 bombas HPLC nomeadas “bomba da zona 2”, “bomba do solvente”, “bomba da alimentação” e “bomba do extrato”, localizados na zona 2, entrada de solvente, na entrada de alimentação e saída do extrato, respectivamente. Vale ressaltar a ausência de bomba na seção do refinado. As 4 bombas HPLC juntamente com as válvulas de troca de posição têm a sua troca coordenada por um sistema supervisorio desenvolvido no software LabView® (National Instruments), como ilustrado na Figura 4.1.

**Figura 4.1.** Sistema supervisorio da unidade de LMS construída.



### a- Experimentos no LMS

Cada experimento durou cinco ciclos e foram realizados em triplicata. No sexto tempo de troca do quinto ciclo (i.e., o experimento

já se encontrava na região de Estado Estacionário Cíclico - EEC), todo volume do líquido foi coletado em cada uma das correntes de saída. Em seguida, parte do volume coletado foi acondicionado em um vial e analisado em triplicata no HPLC com 1 mL/min de vazão de solvente. A Tabela 4.1 mostra mais detalhes das corridas realizadas.

**Tabela 4.1.** Experimentos realizados na unidade de LMS

Run 1				Run 2			
$\bar{Q}_1$	$\bar{Q}_2$	$\bar{Q}_3$	$\bar{Q}_4$	$\bar{Q}_1$	$\bar{Q}_2$	$\bar{Q}_3$	$\bar{Q}_4$
8,141 ±0,009	5,063	6,012 ±0,046	4,038 ±0,057	3,270 ±0,004	2,046	2,966 ±0,099	1,584 ±0,093
$\bar{Q}_D$		$\bar{Q}_F$	$t_{switch}$	$\bar{Q}_D$		$\bar{Q}_F$	$t_{switch}$
4,103±0,053		0,949 ±0,046	3,57	1,686±0,089		0,919 ±0,099	8,82
$\bar{Q}_X$		$\bar{C}_{A,X}$	$\bar{C}_{B,X}$	$\bar{Q}_X$		$\bar{C}_{A,X}$	$\bar{C}_{B,X}$
3,078±0,0009		0,16±0,03	<0,06	1,224±0,004		0,18±0,01	<0,06
$\bar{Q}_R$		$\bar{C}_{A,R}$	$\bar{C}_{B,R}$	$\bar{Q}_R$		$\bar{C}_{A,R}$	$\bar{C}_{B,R}$
1,974±0,045		-	0,28±0,02	1,382±0,006		0,17±0,02	0,37±0,01
$Pe_{i,j}$		$a_{i,j}$		$Pe_{i,j}$		$a_{i,j}$	
>2340		>157		<2340		<388	
Run 3				Run 4			
$\bar{Q}_1$	$\bar{Q}_2$	$\bar{Q}_3$	$\bar{Q}_4$	$\bar{Q}_1$	$\bar{Q}_2$	$\bar{Q}_3$	$\bar{Q}_4$
4,364 ±0,004	2,266	3,258 ±0,041	2,195 ±0,043	3,325 ±0,012	1,830	2,833 ±0,140	1,682 ±0,151
$\bar{Q}_D$		$\bar{Q}_F$	$t_{switch}$	$\bar{Q}_D$		$\bar{Q}_F$	$t_{switch}$
2,188±0,040		0,973±0,041	6,62	1,643±0,141		1,003 ±0,140	8,75

Run 3			Run 4				
$\bar{Q}_X$	$\bar{C}_{A,X}$	$\bar{C}_{B,X}$	$\bar{Q}_X$	$\bar{C}_{A,X}$	$\bar{C}_{B,X}$		
2,098±0,004	0,26±0,02	<0,06	1,495±0,012	0,22±0,04	<0,06		
$\bar{Q}_R$	$\bar{C}_{A,R}$	$\bar{C}_{B,R}$	$\bar{Q}_R$	$\bar{C}_{A,R}$	$\bar{C}_{B,R}$		
1,064±0,003	-	0,53±0,01	1,150±0,12	0,12±0,01	0,39±0,03		
Pe <sub>ij</sub>	a <sub>ij</sub>		Pe <sub>ij</sub>	a <sub>ij</sub>			
>2340	>291		>2340	>385			
Run 5				Run 6			
$\bar{Q}_1$	$\bar{Q}_2$	$\bar{Q}_3$	$\bar{Q}_4$	$\bar{Q}_1$	$\bar{Q}_2$	$\bar{Q}_3$	$\bar{Q}_4$
8,109 ±0,030	5,063	6,243 ±0,141	4,243 ±0,128	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
$\bar{Q}_D$	$\bar{Q}_F$	t <sub>switch</sub>		$\bar{Q}_D$	$\bar{Q}_F$	t <sub>switch</sub>	
3,866±0,153	1,181±0,141	3,57		4,10	4,10	45,0	
$\bar{Q}_X$	$\bar{C}_{A,X}$	$\bar{C}_{B,X}$	$\bar{Q}_X$	$\bar{C}_{A,X}$	$\bar{C}_{B,X}$	$\bar{Q}_X$	$\bar{C}_{A,X}$
3,046±0,030	0,70±0,03	<0,06	2,60	2,71	0,30	$\bar{Q}_X$	$\bar{C}_{A,X}$
$\bar{Q}_R$	$\bar{C}_{A,R}$	$\bar{C}_{B,R}$	$\bar{Q}_R$	$\bar{C}_{A,R}$	$\bar{C}_{B,R}$	$\bar{Q}_R$	$\bar{C}_{B,R}$
2,000±0,015	<0,06	1,25±0,02	1,80	0,25	3,74	$\bar{Q}_R$	$\bar{C}_{B,R}$
Pe <sub>ij</sub>	a <sub>ij</sub>			Pe <sub>ij</sub>	a <sub>ij</sub>		
>2340	>157			n.d.	n.d.		

**Parâmetros de desempenho:** Os valores das variáveis de desempenho obtidos em cada experimento foram comparados com aqueles encontrados na literatura (Rodrigues *et al.*, 2015):

$$Pur_{i,out} = \frac{\bar{C}_{i,out}}{\bar{C}_{A,out} + \bar{C}_{B,out}} \quad (4.1)$$

$$Rec_{i,out} = \frac{\bar{Q}_{out} \bar{C}_{i,out}}{\bar{Q}_F \bar{C}_{i,F}} \quad (4.2)$$

$$Pr_i = \frac{(60.24) \cdot \bar{Q}_{out} \bar{C}_{i,out}}{m_{ads} \cdot N_{column}} \quad (4.3)$$

$$DC = \frac{\bar{Q}_D + \bar{Q}_F}{\bar{Q}_F \cdot (\bar{C}_{A,F} + \bar{C}_{B,F})} \quad (4.4)$$

onde:  $Pur_{i,out}$  é a pureza ótica do componente  $i$  (A ou B) em uma das correntes de saída (extrato ou refinado) (%),  $Rec_{i,out}$  é o grau de recuperação do componente  $i$  em uma das correntes de saída (%),  $Pr_i$  é a produtividade do componente  $i$  (g/kg<sub>ads</sub>.dia),  $DC$  é o consumo de dessorvente (L/g<sub>rac</sub>),  $C_{i,out}$  é a concentração média do componente  $i$  em uma das correntes de saída (g/L),  $Q_{out}$  é a vazão volumétrica média em uma das correntes de saída (mL/min),  $Q_F$  é a vazão volumétrica média na corrente de alimentação da mistura racêmica (mL/min),  $C_{i,f}$  é a concentração média do componente  $i$  na corrente de alimentação da mistura racêmica (gi/L),  $N_{column}$  é o número de colunas cromatográficas na unidade de LMS (-),  $m_{ads}$  é a massa de adsorvente em cada coluna (kg<sub>ads</sub>) e  $Q_D$  é a vazão volumétrica média de entrada de dessorvente (mL/min). A concentração média foi definida como (Ridrigues *et al.*, 2015):

$$\bar{C}_{i,out} = \int_t^{t+t_{switch}} \frac{C_{i,out}}{t_{switch}} dt \quad (4.5)$$

onde  $t_{switch}$  (min) é o tempo de troca

## 4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.3.1. Parâmetros Calculados

A porosidade total de cada coluna  $j$ , o erro experimental e os coeficientes de correlação são mostrados na Tabela 4.2. É importante notar que a diferença relativa entre a maior e a menor porosidade é menor que 1%. Indicando, portanto, a homogeneidade deste parâmetro entre as colunas utilizadas.

**Tabela 4.2.** Porosidade, erros calculados e coeficientes de determinação para cada coluna.

Coluna $j$	$\epsilon_{t,j}$ (-)	$\delta_{\epsilon_{t,j}}$ (-)	$R_j^2$ (-)
1	0,7410		0,999
2	0,7389		0,999
3	0,7384		0,999
4	0,7455	$\pm 0,0006$	0,998
5	0,7446		0,999
6	0,7427		0,999

O coeficiente de Henry de cada soluto (A ou B) de cada coluna  $j$ , os erros experimentais e coeficientes de determinação mostrados na Tabela 4.3. Discussão semelhante feita para as porosidades são válidas sobre os coeficientes de Henry.

A porosidade média, constante de Henry médio para cada enantiômero e a dispersão ao redor da média de todas as colunas estão disponíveis na Tabela 4.4.

É essencial destacar os erros apresentados nas Tabelas 4.2 e 4.3, que representam os erros experimentais. Em contraste com os erros da Tabela 4.4 que representam a dispersão entre as médias das colunas cromatográficas utilizadas na unidade de LMS.

**Tabela 4.3.** Constante de Henry, erros experimentais e coeficientes de determinação para cada coluna.

Coluna $j$	$H_{A,j} (-)$	$\delta H_{A,j} (-)$	$R_{A,j}^2 (-)$
1	9,38		0,999
2	9,11		0,999
3	9,28		0,999
4	9,55	$\pm 0,04$	0,997
5	9,38		0,999
6	9,30		0,999
Coluna $j$	$H_{B,j} (-)$	$\delta H_{B,j} (-)$	$R_{B,j}^2 (-)$
1	5,05		0,999
2	4,91		0,999
3	5,01		0,999

Coluna j	$H_{B,j}(-)$	$\delta H_{B,j}(-)$	$R_{B,j}^2(-)$
4	5,15	$\pm 0,02$	0,995
5	5,04		0,999
6	5,01		0,999

**Tabela 4.4.** Cálculo da porosidade e do coeficiente de Henry médios e o desvio padrão entre as colunas.

$\bar{E}_t$	$\bar{H}_A$	$\bar{H}_B$
$0,742 \pm 0,003$	$9,33 \pm 0,15$	$5,03 \pm 0,08$

Os coeficientes de transferência de massa de cada soluto (A ou B) de cada coluna  $j$ , os erros experimentais e os coeficientes de determinação são mostrados na Tabela 4.5. Este coeficiente leva em consideração os efeitos de transferência de massa dentro de cada coluna cromatográfica.

Todos os parâmetros acima mais os coeficientes de dispersão axial foram importantes para interpretar os fenômenos envolvidos nos experimentos com LMS.

**Tabela 4.5.** Coeficiente de transferência de massa efetivo, erros experimentais e coeficientes de determinação.

Coluna j	$k_{eff,A,j}$	$\delta k_{eff,A,j}(\text{min}^{-1})$	$R_{A,j}^2(-)$
1	46	$\pm 4$	0,995
2	55	$\pm 4$	0,997
3	45	$\pm 3$	0,997
4	44	$\pm 4$	0,997

Coluna j	$k_{eff,A,j}$	$\delta k_{eff,A,j}$ (min <sup>-1</sup> )	$R_{A,j}^2$ (-)
5	47	± 4	0,997
6	45	± 4	0,998
Coluna j	$k_{eff,B,j}$	$\delta k_{eff,B,j}$ (min <sup>-1</sup> )	$R_{B,j}^2$ (-)
1	78	± 2	0,996
2	92	± 2	0,997
3	76	± 2	0,997
4	75	± 2	0,998
5	79	± 2	0,997
6	77	± 2	0,998

### 4.3.2. Avaliação dos Fenômenos de Transferência de Massa Dentro das Colunas Cromatográficas

A análise do número de Péclet (Pe) para cada coluna j utilizando as Equações 4.6 e 4.7:

$$D_{app,i,j,n} = \frac{A_{i,j} u_{m,j,n}}{2} \tag{4.6}$$

$$Pe_{i,j} = \frac{u_{m,j,n} L}{D_{app,i,j,n}} \tag{4.7}$$

O parâmetro  $A_{i,j}$  (Tabela 4.6) é um parâmetro experimental que depende de cada enantiômero e de cada coluna cromatográfica  $j$ . Outros parâmetros como  $C_{ij}$  também são apresentados.

**Tabela 4.6.** Parâmetros  $A_{i,j}$  e  $C_{i,j}$ .

Coluna j	$A_{Aj}$	$C_{Aj}$	$A_{Bj}$	$C_{Bj}$
1	0,0072	0,0078	0,0060	0,0060
2	0,0085	0,0066	0,0072	0,0050
3	0,0063	0,0080	0,0057	0,0061
4	0,0062	0,0081	0,0056	0,0061
5	0,0069	0,0077	0,0060	0,0059
6	0,0063	0,0080	0,0058	0,0060

Substituindo a Equação 4.6 na Equação 4.7, obtém-se a Equação 4.8 para o número de Péclet, com valores apresentados na Tabela 4.7:

$$Pe_{i,j} = \frac{2L}{A_{i,j}} \quad (4.8)$$

**Tabela 4.7.** Número de Péclet para as espécies A e B de cada coluna.

Coluna j	$Pe_{Aj}$	$Pe_{Bj}$
1	2765	3335
2	2340	2777

Coluna j	Pe <sub>Aj</sub>	Pe <sub>Bj</sub>
3	3163	3535
4	3223	3541
5	2914	3359
6	3151	3461

A análise do número de Pe para todas as colunas e enantiômeros indica que a taxa de transporte advectivo é no mínimo 2340 vezes maior do que a taxa de transporte dispersivo. Esta magnitude significa que o fenômeno de transporte advectivo pode ser negligenciado no interior das colunas cromatográficas utilizadas na unidade de LMS e, portanto, o transporte advectivo prevalece.

Um outro número adimensional utilizado foi o número de unidades de transferência de massa para cada espécie i na coluna j. Equação 4.9:

$$\alpha_{i,j} = \frac{k_{e j j,i,j} L}{u_{solid}} \tag{4.9}$$

Este número adimensional varia com a mudança de tempo de troca dos experimentos, já que o tempo de troca está relacionado à velocidade de sólido. Todos os experimentos foram realizados com a unidade operando no modo padrão (*i.e.*, todas as válvulas operaram com tempo de troca igual e constante durante todos os ciclos), portanto no mesmo experimento, o  $\alpha_{i,j}$  varia com o coeficiente de transferência de massa para cada soluto (A ou B) para cada coluna j,  $k_{e j j,i,j}$ . A Tabela 4.8 mostra que para cada experimento o valor de  $\alpha_{A,4}$  é o menor.

**Tabela 4.8.** Número adimensional de unidade de transferência de massa para a enantiômero A na coluna 4.

	Run 1	Run 2	Run 3	Run 4	Run 5
$a_{A,4}$	157	388	291	385	157

Pela Tabela 4.8, pode ser observado que a transferência de massa entre líquido e sólido é no mínimo 157 vezes maior do que o movimento convectivo no processo idealizado de LMV. Ao interpretar para o LMS, quanto menor a duração do tempo de troca, menor a influência da transferência de massa entre a fase sólida e líquida. Em outras palavras, o coeficiente de dispersão axial e a transferência de massa entre a fase líquida e sólida podem ser negligenciadas dentro da coluna. Portanto, a hipótese de equilíbrio não requer o balanço de massa na fase sólida, porque assim que a fase sólida entra em contato com a fase líquida, um processo adsorptivo é imediatamente estabelecido na interface sólida-líquida e dentro da partícula do adsorvente, porque os efeitos de transferência de massa são rápidos o suficiente para não serem a etapa limitante:

$$\frac{\partial q_{i,j}}{\partial t} = \frac{\partial q_{e,i,j}}{\partial t} \quad (4.10)$$

onde  $q_{e,i,j}$  é a concentração do componente i na coluna j em equilíbrio com a fase sólida (g/L).

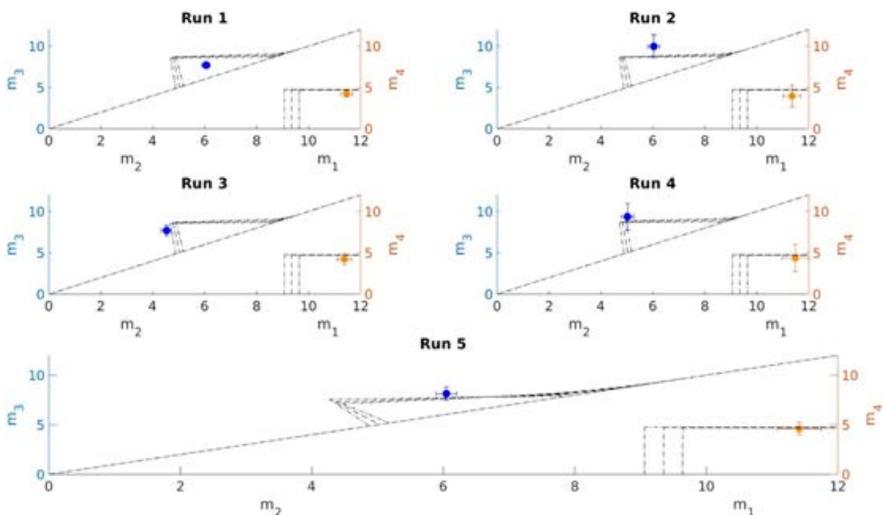
Em um trabalho previamente desenvolvido em nosso laboratório, a isoterma de Langmuir multicomponente foi selecionada como um modelo adequado para a representação do equilíbrio termodinâmico entre os enantiômeros de PZQ e a fase estacionário considerada (Santos, 2016).

### 4.3.3. Separação de PZQ utilizando o Processo de LMS com a Chiralcel™ como Fase Estacionária Quiral

Os principais resultados de cada experimento podem ser visualizados na Tabela 4.9 e Figura 4.2, cujas informações adicionais dos 5 experimentos realizados, são listadas.

- *Run 1*: dentro da área de separação (área A) na Figura 4.2;
- *Run 2*: dentro da área de extrato puro e refinado contaminado (área C) na Figura 4.2;
- *Run 3*: dentro da área de extrato contaminado e refinado puro (área B) na Figura 4.2;
- *Run 4*: próximo ao ponto de máxima produtividade no vértice da área de separação na Figura 4.2; e
- *Run 5*: dentro do triângulo de separação (área A) na Figura 4.2, esta corrida foi a de maior concentração entre todas.

**Figura 4.2.** Teoria do equilíbrio para a determinação das áreas de operação nos experimentos *Run 1*, *Run 2*, *Run 3*, *Run 4* e *Run 5*.



O primeiro experimento (*Run 1*) foi proposto intencionalmente na área de total separação/regeneração (ver Figura 4.1). Neste cenário conservativo, a unidade de operação de LMS é robusta, o que significa, a variação das constantes de equilíbrio devido às variações bruscas na temperatura (i.e., oscilação dos parâmetros termodinâmicos), concentração de alimentação, porosidade da coluna e as flutuações nas vazões entregues pelas bombas não têm um papel importante na separação, estas são perturbações ignoradas pela teoria do equilíbrio (Gomes, 2009; Abel *et al.*, 2005). Portanto, o cenário esperado seria o de total separação dos enantiômeros no extrato e refinado. Entretanto, a pureza do D-PZQ (A) no extrato foi de 97% e a pureza do L-PZQ (B) no refinado foi de 100%. Apesar da alta pureza na corrente do extrato, a completa separação não ocorreu principalmente devido ao número de colunas por zona ser finito; a quinta consideração fundamental imposta pela teoria do equilíbrio (i.e., infinitas colunas por zona) nunca poderá ser satisfeita. As zonas 2 e 3 são as responsáveis pela separação da mistura racêmica do praziquantel (PZQ) que entra (QF) e ambas possuem duas colunas cada. Esta é uma situação bem distante do número infinito de colunas imposto pela teoria do equilíbrio. A mesma discussão é válida para as zonas 1 e 4, responsáveis pela regeneração da fase sólida e fase líquida, respectivamente, e cada coluna tem somente uma coluna cromatográfica.

Em comparação com a *Run 1*, o cenário proposto pelo segundo experimento (*Run 2*) manteve constante as razões entre vazões nas zonas 1, 2 e 4, mas houve um aumento na zona 3, que foi suficiente para levar a operação para a região de refinado contaminado (Figura 4.1). Os resultados esperados coincidem com as observações experimentais. A pureza na corrente de extrato foi de 100% de D-PZQ e na corrente de refinado houve contaminação com o D-PZQ. Como praticamente nenhum L-PZQ foi detectado na corrente de extrato, seu grau de recuperação no refinado foi de 100%. Por outro lado, parte do D-PZQ saiu no refinado como contaminante, esta foi a razão para observar a queda na sua recuperação e, conseqüentemente, em sua produtividade, enquanto a produtividade do L-PZQ permanece a mesma da *Run 1*.

**Tabela 4.9.** Comparação entre este trabalho, Ching *et al.* (2013) e Lim *et al.* (1995).

	Run 1	Run 2	Run 3	Run 4	Run 5	Ching*	Lim*
$C_{A\text{OU}B\text{F}}^{\#}$	0,55 $\pm 0,03$	0,53 $\pm 0,05$	0,57 $\pm 0,01$	0,46 $\pm 0,02$	2,02 $\pm 0,04$	25	25
$Pur_{A,X}^{\#}$	97 $\pm$ 2	99 $\pm$ 1	98,6 $\pm$ 0,2	98 $\pm$ 1	98 $\pm$ 1	90,1	85,9
$Pur_{B,R}^{\#}$	100 $\pm$ 0	68 $\pm$ 2	100 $\pm$ 0	78 $\pm$ 2	97,1 $\pm$ 0,2	93,7	97,5
$Rec_{A,X}^{\#}$	94 $\pm$ 10	47 $\pm$ 4	96 $\pm$ 3	71 $\pm$ 6	90 $\pm$ 4	94	98
$Rec_{B,R}^{\#}$	104 $\pm$ 10	102 $\pm$ 3	100 $\pm$ 3	97 $\pm$ 3	103 $\pm$ 5	90	84
$Pr_A^{\#}$	24 $\pm$ 4	11 $\pm$ 1	27 $\pm$ 2	16 $\pm$ 3	107 $\pm$ 4	115	n.d.
$Pr_B^{\#}$	27 $\pm$ 3	26 $\pm$ 1	28,4 $\pm$ 0,5	22 $\pm$ 2	125 $\pm$ 2	110	n.d.
$DC^{\#}$	4,8 $\pm$ 0,4	2,5 $\pm$ 0,3	2,8 $\pm$ 0,1	2,9 $\pm$ 0,3	1,06 $\pm$ 0,02	0,29	0,35
$t_{switch}^{\#}$	3,55	8,78	6,58	8,71	3,55	45,0	30,0

\*erros experimentais não disponíveis (n.d.). \*A e B são D-PZQ e L-PZQ, respectivamente.

$\# \bar{C} = [g/L]$ ;  $Pur = Rec = [-]$ ;  $Pr = [g/kgdia]$ ;  $DC = [g_i/L]$ ;  $t_{switch} = [min]$

O terceiro experimento (*Run 3*) manteve constante a razão entre as vazões na zona 1, 3 e 4, mas houve uma diminuição da razão entre vazões na zona 2, que foi suficiente para que a unidade operasse na região de extrato contaminado (ver Figura 4.1). Portanto, altas recuperações de ambos enantiômeros ajudaram a manter a produtividade no mesmo patamar da *Run 1*. O L-PZQ, 98,6%, contaminou pouco o extrato e a pureza do L-PZQ no refinado foi de 100%. Neste experimento a unidade operou fora, porém, próximo da área de separação.

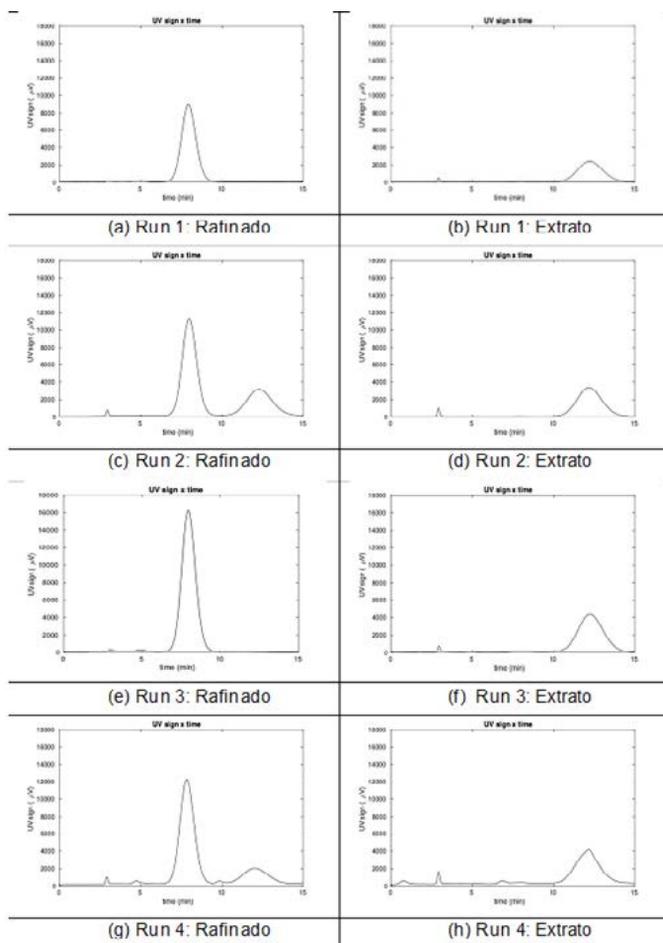
O quarto experimento (*Run 4*) tem a intenção de fazer com que a unidade de LMS opere perto do vértice do triângulo. Neste ponto, a separação deverá ocorrer, mas agora com o máximo de produtividade e menor (mas não mínimo) consumo de dessorvente. Este experimento é um ponto de operação almejado, contudo as condições não foram robustas suficiente para se operar neste ponto, pois a operação torna-se muito sensível às mudanças de temperatura (i.e., oscilação dos parâmetros termodinâmicos), às flutuações nas vazões das bombas de HPLC e ao número finito de colunas na unidade real do LMS. Como esperado, a unidade correu fora da área de separação, culminando na contaminação da corrente do refinado. Este experimento evidencia a necessidade de uma boa estratégia de controle com o intuito de mudar o ponto de operação o mais próximo possível do vértice do triângulo. Os experimentos *Run 1*, *Run 2*, *Run 3* e *Run 4* validaram a unidade de LMS construída.

O quinto experimento (*Run 5*) foi realizado objetivando a escala semi-preparativa. Como consequência, a produtividade aumentou e o consumo de dessorvente diminuiu, ambos significativamente. Esta situação evidencia a principal razão em operar a unidade real de LMS em altas concentrações (i.e., região não-linear das isotermas). Os cromatogramas típicos de cada experimento estão apresentados na Figura 4.3 e Figura 4.4.

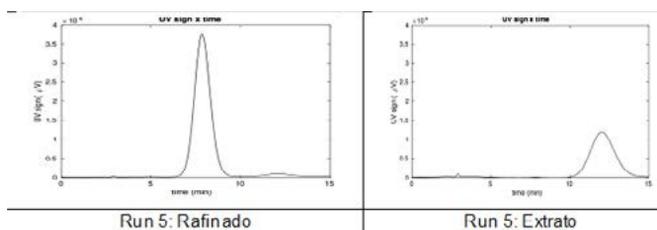
Apesar das concentrações de entrada de mistura racêmica nos trabalhos de Ching *et al.* (1993) e Lim *et al.* (1995) serem aproximadamente 10 vezes maior do que as do quinto experimento realizado neste trabalho (*Run 5*), quase todos os parâmetros de desempenho ficaram muito próximos ou foram até superiores aos da literatura (ver Tabela 4.9). Na

Run 5 os parâmetros de desempenho relacionados à corrente de extrato foram muito similares ou superiores aos dois trabalhos da literatura.; a alta pureza do D-PZQ é o parâmetro de desempenho que se destaca. Enquanto os outros parâmetros estão muito próximos entre si. A corrente do refinado produz L-PZQ com pureza de 97,1%, 100% de recuperação e produtividade 14% maior do que a relatada pelo grupo de Ching *et al.* (1993). Este é um cenário interessante, uma vez que o composto de principal interesse na separação é o L-PZQ por ser o princípio ativo contra doenças parasitárias. A comparação da produtividade alcançada com o trabalho do grupo de Lim *et al.* (1995) não pôde ser realizada, por não estar disponível no trabalho a quantidade de fase quiral estacionária disponível. Estes resultados são interessantes, porque uma boa produção de correntes com enantiômeros puros pôde ser produzida continuamente pela unidade de LMS construída. O quinto experimento não superou o parâmetro de desempenho conhecido como consumo de dessorvente; isto aconteceu graças à alta concentração de mistura racêmica em comparação com os trabalhos da literatura. Mas o consumo de dessorvente na Run 5 diminuiu 4,5 vezes em comparação com a corrida Run 1, graças ao aumento na corrente de alimentação de 1 para 4 g/L de racemato. É importante enfatizar que a concentração de alimentação reportada na literatura é, aproximadamente, 10 vezes superior ao que foi utilizado no quinto experimento deste trabalho. A presença da zona 4 (i.e., reciclo de dessorvente) diminuiu o consumo de dessorvente fresco, o que é altamente desejável almejando a escala preparativa.

**Figura 4.3.** Cromatogramas típicos obtidos nos experimentos realizados nas corridas *Run 1*, *Run 2*, *Run 3* e *Run 4*.



**Figura 4.4.** Cromatogramas típicos obtidos no experimento realizado na corrida *Run 5*.



Uma outra característica importante é a dinâmica mais rápida da unidade utilizada neste trabalho. Isso é consequência do uso da fase estacionária tris(3-cloro 4-metil fenil carbamato) celulose (Chiracel™ OZ) como fase quiral estacionária. Esta CSP permitiu uma melhora na eficiência da separação graças à melhor estabilidade mecânica em comparação com a MCTA e à sua estrutura molecular, que possui substituintes situados nos anéis aromáticos do grupo fenil (maiores detalhes ver [55],[64]). Isto faz com que esta CSP não seja solúvel em solventes polares (como o etanol), o que é desejável, uma vez que o PZQ possui alta solubilidade no etanol. Apesar disso, a porosidade intersticial em cada coluna cromatográfica foi muito alta, permitindo uma grande área de contato entre as fases sólida e líquida. Nossa unidade atingiu o Estado Estacionário Cíclico (EEC) muito mais rapidamente, em aproximadamente, 106 minutos no experimento Run 5, enquanto no trabalho de Ching *et al.* (1993) o EEC foi alcançado em 540 minutos (= 9 horas) e o trabalho de Lim *et al.* (1995) não está evidente o tempo necessário para alcançar o EEC, mas com 30 minutos de tempo de troca, 8 colunas cromatográficas e MCTA como CSP provavelmente a unidade de LMS atingiu o seu EEC em algumas horas (> 106 minutos).

*Run 1*, *Run 3* e *Run 5* produziram alta pureza em ambas as correntes, especialmente as corridas *Run 1* e *Run 3*, que produziram 100% de pureza de L-PZQ no refinado. A importância do L-PZQ não está restrita somente à fabricação de medicamentos. Modificações na estrutura molecular têm sido alvo de estudos com o intuito de produzir um princípio ativo contra os parasitas mais resistentes e contra os parasitas jovens.

Todas as corridas produziram na corrente de extrato alta pureza de D-PZQ. Isto é desejável para os estudos de racemização, nos quais racemato de PZQ é produzido a partir do D-PZQ puro. Isto permitirá a melhoria dos parâmetros de desempenho, uma vez que o D-PZQ que sai no extrato poderá retornar à corrente de alimentação como racemato.

## 4.4 CONCLUSÕES

A unidade de LMS construída foi testada em diferentes condições e em sua maioria manteve ao menos uma corrente com alto grau de pureza. Na Run 1 e Run 3, o L-PZQ foi produzido na corrente de refinado com 100% de pureza. Na Run 2, a corrente de extrato produziu 100% de pureza para o D-PZQ. Quando a pureza foi alta, o grau de recuperação e produtividade também foram. O tempo necessário para atingir o EEC também foi uma vantagem em comparação com as separações de PZQ utilizando LMS encontradas na literatura. Muitos parâmetros de desempenho passaram os da literatura, que utilizou 50 gL<sup>-1</sup> de concentração de racemato. A unidade de LMS construída pôde operar com melhor desempenho mesmo utilizando uma concentração de entrada de racemato 10 vezes menor. O projeto do LMS juntamente com a fase estacionária utilizada permitiu separar os enantiômeros mais eficientemente. É importante ter em mente que não somente o L-PZQ é importante, mas também o D-PZQ para diferentes estudos científicos.

# LEITURA COMPLEMENTAR



Os leitores que desejam aprofundar conhecimentos sobre o tema abordado poderão utilizar as seguintes referências:

Guiochon, G., Shirazi, Lin, B., **Modeling for Preparative**, Academic Press, London, 2003, p. 342.

**Ruthvenm D.M. Principles of Adsorption and Adsorption Prozesse**, John Wiley & Sons, Inc., 1984.

Schimid-Traub, H., **Preparative chromatography**, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co, Weinheim, 2005.

Rodrigues, A.E>, pereira, C., Minceva, M., Pais, L.S., Ribeiro, A.M., Robeiro, A., Silva, M., Graça, N., Santos, J.C. **Simulated moving bed technology**, Elsevier, 2015.

Broughton, D.B., Gerhold, C.G. **Continuous sorption process employing fixed bed of sorbent and moving inlets and outlets**. US2985589, 1961.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro - FAPERJ pelo apoio financeiro ao projeto, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico - CNPq - e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES pela concessão das bolsas.

## REFERÊNCIAS

Abel, S., Erdem, G., Amanullah, M. Optimizing control of simulated moving beds - experimental implementation. *Journal of Process Control*. 1092: 2-16, 2005.

Andrade, A., Secchi, A., Souza, M., Barreto, A.G. Nonlinear model predictive control applied to the separation of praziquantel in simulated moving bed chromatography. *Journal of Chromatography A*. 1470: 42-49, 2016

Bustinduy, A.L., Waterhouse, D., Sousa-Figueiredo, J.C. Population pharmacokinetics and pharmacodynamics of praziquantel in Ugandan children with intestinal schistosomiasis: Higher dosages are required for maximal efficacy. *American Society for Microbiology*. 7: e00227-16, 2016.

Bustinduy, A.L., Wright, S., Joekes, E.C. One hundred years of neglect in paediatric schistosomiasis. *Parasitology*. 144: 1613-1623, 2017.

Chankvetadze, B. Recent developments on polysaccharide-based chiral stationary phases for liquid-phase separation of enantiomers. *Journal of Chromatography A*. 1269: 26-51, 2012.

Chankvetadze, B., Yashima, E., Okamoto, Y. Tris(chloro- and methyl-disubstituted phenylcarbamate)s of cellulose as chiral stationary phases for chromatographic enantioseparation. *Chemistry Letters*. 22: 617-620, 1993.

Chankvetadze, B., Yashima, E., Okamoto, Y. Dimethyl-, dichloro and chloromethylphenylcarbamates of amylose as chiral stationary phases for high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*. 694: 101-109, 1995.

Ching, C., Lim, B., Lee, E. Preparative resolution of praziquantel enantiomers by simulated counter-current chromatography. *Journal of Chromatography* 634: 215-219, 1993.

Doenhoff, M.J., Cioli, D., Utzinger, J. Praziquantel: mechanisms of action, resistance and new derivatives for schistosomiasis. *Current Opinion in Infectious Diseases*. 21: 659-667, 2009.

Doenhoff, M.J., Kusel, J.R., Coles, G.C. Resistance of *Schistosoma mansoni* to praziquantel: is there a problem? *Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine And Hygiene*. 96: 465-469, 2002.

Dong, Y., Chollet, J., Vargas, M. Praziquantel analogs with activity against juvenile *Schistosoma mansoni*. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*. 20: 2481-2484, 2010

Gomes, P.S. *Advances in Simulated Moving Bed: New operating modes; new design methodologies; and product (FlexSMB-LSRE) development*. Ph.D. Porto, Portugal., 2009.

Guglielmo, S., Cortese, D., Vottero & F., Rolando, B.; Kommer, V.P., Williams, D.L.; Fruttero, R., Gasco, A. New praziquantel derivatives containing NO-donor furoxans and related furazans as active agents against *Schistosoma mansoni*. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 84: 135-145, 2014.

Henner, E.S.T. *Preparative Chromatography*. Wiley-VCH Verlag GmbH and Co, 2012.

Lammerhofer, M., Lindner, W. Recent developments in liquid chromatographic enantioseparation. In: *Separation Methods in Drug Synthesis and Purification* (6 ed.). Elsevier Science B. V. 2000.

Lim, B. G., Ching, C. B. Modelling studies on the transient and steady state behaviour of a simulated counter-current chromatographic system. *Separations Technology*. 6: 29-41, 1996a

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, 1996b.

Lim, B.G., Ching, C.B., Tan, R.B. Recovery of (-)-Praziquantel from racemic mixtures by continuous chromatography and crystallisation. *Chemical Engineering Science*. 14: 2289-2298, 1995.

Malhado, M., Pinto, D., Silva, A.C. Preclinical pharmacokinetic evaluation of praziquantel loaded in poly (methyl methacrylate) nanoparticle using a HPLC-MS/MS. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 117: 405-412, 2016

Melman, S.D., Steinnauer, M.L., Cunningham, C. Reduced susceptibility to praziquantel among naturally occurring kenyan isolates of *Schistosoma mansoni*. *Neglected Tropical Diseases*. 3: e504, 2009

Meyer, T., Sekljic, H., Fuchs, S. Taste, A New Incentive to Switch to (R)-Praziquantel in Schistosomiasis Treatment. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 3: e357, 2009.

Paiva, T., Vieira, L., Melo, P. In situ incorporation of praziquantel in polymer microparticles through suspension polymerization for treatment of Schistosomiasis. *Macromolecular Reaction Engineering*. 13: 1800064, 2019.

Reich, M. R., Govindaraj, R., Dumbaugh, K. International strategies for tropical disease treatments. Experiences with praziquantel (1 ed.). Harvard University, 1998.

Rodrigues, A.E., Pereira, C., Minceva, M. Simulated Moving Bed Technology (1 ed.). Elsevier Inc, 2015.

Santos, R.C. Estudo do Equilíbrio de Adsorção entre os Enantiômeros do Praziquantel e a fase Sólida Celulose Tris 3-Cloro, 4-Metil Fenilcarbamato por meio de Regressão Não Linear de Modelos de Isotermas. Tese UFRJ. 2016.

The pediatric formulation. (20 de julho de 2021). Fonte: <https://www.pediatricpraziquantelconsortium.org/node/36>

Duan, W.W., Qiu, S.J., Zhao, Y. Praziquantel derivatives exhibit activity against both juvenile and adult *Schistosoma japonicum*. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*. 22: 1587-1590, 2012.

WHO Model List of Essential Medicines. (20 de junho de 2021). Fonte: <https://www.who.int/groups/expert-committee-on-selection-and-use-of-essential-medicines/essential-medicines-lists>

Zheng, Y., Dong, L., Hu, C. Development of chiral praziquantel analogues as potential drug candidates with activity to juvenile *Schistosoma japonicum*. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 24, p. 4223-4226, 2014.

# 5

## **Análise técnico-econômica e cromatografia em contracorrente na purificação de biofármacos**

**João Henrique Picado Madalena Santos<sup>1</sup>**

**Larissa Pereira Brumano<sup>1,2</sup>**

**Adalberto Pessoa Junior<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica, Universidade de São Paulo – Av. Prof. Lineu Prestes 580, Butantã. São Paulo-São Paulo, Brasil. 05508-000.

<sup>2</sup> Centro de Ciências Naturais e Humanas, Universidade Federal do ABC – Campus Santo André - Avenida dos Estados, 5001. Santa Terezinha. Santo André - SP - Brasil. 09210-580.



# RESUMO

Com o crescente avanço da biotecnologia, sobretudo na área farmacêutica, muitos dos bioprocessos pretendem não só ser eficientes e viáveis à escala laboratorial, mas também terem o potencial de serem escalonados garantindo a viabilidade econômica e técnica do processo. Desta forma a análise técnico-econômica tem sido alvo de estudo em diversos bioprocessos de forma a identificar os principais impedimentos e fatores críticos, sobretudo nos processos de purificação. Dessa forma, este capítulo pretende elucidar os conceitos base deste tipo de análise, bem como dar ao leitor ferramentas para o aplicar em nível prático. Como uma das etapas mais críticas do processo é a purificação, pretendemos também explorar uma das mais recentes tecnologias de purificação, a cromatografia em contracorrente (CCC), cuja elevada versatilidade e vantagens sobre a cromatografia líquida convencional a tornam uma excelente candidata para ser aplicada em bioprocessos. A separação de biomoléculas extraídas de biomassa, juntamente com modos básicos de operação e métodos de eluição em CCC, enfatizando a versatilidade das técnicas no contexto de biorrefinaria, biotecnologia farmacêutica e química analítica serão analisadas neste capítulo.

## 5.1 INTRODUÇÃO

As etapas de *downstream* (separação e purificação) apresentam um grande número de parâmetros de processo potencialmente críticos que mostram as interações entre as operações unitárias, cujas etapas precisam ser bem avaliadas antes da ampliação de escala (Meitz *et al.*, 2014). Além disso, as etapas de *downstream* representam cerca de 60-80% do custo total de produção de produtos biofarmacêuticos e, por isso, é crucial a operação em condições otimizadas e, quando possível, a substituição dos métodos tradicionais por técnicas alternativas mais eficientes e econômicas, diminuindo o número de operações unitárias (Buyel e Fischer, 2014; Tundisi *et al.*, 2017).

Devido à importância da análise econômica dos processos de purificação, nesta parte do capítulo trataremos de como compor e analisar os processos de purificação. Apresentaremos um exemplo da literatura sobre a aplicação dessa análise econômica para a avaliação de diferentes cenários para a purificação de uma mesma molécula terapêutica buscando-se obter o menor custo de produção por grama de produto (CoG/g).

A análise econômica é uma parte importante do projeto completo de um processo. Aqui vamos considerar o projeto como sendo um trabalho conceitual que deve ser realizado antes da implantação, da expansão ou da redefinição de um processo. Para tanto, duas etapas são essenciais: a composição e a análise. A composição constitui a seleção e a disposição de uma série de operações unitárias (etapas do processo) capazes de produzir o produto desejado em qualidade e custos aceitáveis. Já a análise é a avaliação e comparação de diferentes composições de processos. Para esta análise, uma integração de conhecimentos científicos e de engenharia são necessários em diferentes níveis de detalhes. Essa etapa é essencial no desenvolvimento do produto para tornar o processo viável e aumentar as suas chances de comercialização.

No desenvolvimento do processo de purificação de uma molécula de interesse, devemos analisar de uma forma integrada aspectos ambientais, econômicos e operacionais, reconhecendo que cada um desses

aspectos interfere na viabilidade técnica-econômica do produto final. Por exemplo, a geração de resíduos de determinada operação unitária deve ser considerada desde o início do desenvolvimento, pois impactará diretamente nos custos finais do processo. Desta forma, é importante um profundo conhecimento das etapas do processo tecnológico integrado a análises ambientais e econômicas para que este seja viável.

Esta análise, assim como a ambiental, é importante não somente durante a implantação, mas durante a seleção de operações unitárias para cada etapa do downstream, obviamente de acordo com os requerimentos e especificidades do produto que será obtido.

Adicionalmente, neste capítulo serão abordados conceitos e aplicações da técnica de cromatografia em contracorrente (CCC) para a purificação de biofármacos. A CCC é uma técnica de separação essencialmente baseada nos princípios da cromatografia líquida (CL), que utiliza duas fases líquidas imiscíveis (ou seja, a fase estacionária e a móvel são fases líquidas de um sistema bifásico em equilíbrio termodinâmico) sem nenhum suporte sólido, sendo a fase estacionária retida numa coluna com auxílio da gravidade ou força centrífuga (Friesen *et al.*, 2015; Melorose *et al.*, 2015; Murayama *et al.*, 1982).

Essa técnica de CL sem suporte surgiu dos equipamentos que realizavam extrações líquido-líquido de distribuição em contracorrente (do inglês CCD, também denominadas de "máquinas Craig") (Melorose *et al.*, 2015). A CCD é uma técnica de química analítica de separação de moléculas desenvolvida por Lyman C. Craig na década de 1940. Esta forma mais simples de extração líquido-líquido é baseada na partição de uma mistura de compostos entre duas fases líquidas imiscíveis em um funil de separação, por meio de um processo de extração por solvente em múltiplos estágios. Embora seja uma técnica primitiva e trabalhosa, Lyman Craig introduziu um método que possibilitou o isolamento e a identificação de inúmeras substâncias, naturais e sintéticas, para fins terapêuticos. A CCC foi inventada em 1966 por Yoichiro Ito, que o nomeou em homenagem à técnica de CCD. O nome dessa técnica analítica e o conveniente acrônimo de CCC foram adotados em todo o mundo para se referir às técnicas de CL sem suporte. No entanto, a escolha desse nome suscitou algumas dúvidas na comunidade científica,

levando a um equívoco concebível sobre o fluxo de contracorrente, que não existe neste tipo de técnica de CL. Como técnica de cromatografia líquida, a CCC usa muitos termos já bem estabelecidos para as técnicas cromatográficas (Berthod, 2007).

Assim, este capítulo de livro objetiva abordar questões importantes para a análise técnico-econômica de processos de purificação, as quais devem ser consideradas desde o início do desenvolvimento do processo, uma vez que alterações tardias levam a perdas e aumento de custos. E fornecerá os fundamentos da técnica de CCC, descrevendo os diferentes tipos de colunas capazes de manter uma fase líquida estática e uma fase líquida móvel usando campos centrífugos. Serão apresentadas aplicações da análise técnico-econômica e CCC na separação de biomoléculas extraídas de biomassa, juntamente com modos básicos de operação e métodos de eluição em CCC, enfatizando a versatilidade das técnicas no contexto de biorrefinaria, da biotecnologia farmacêutica e da química analítica. Finalmente, as tendências recentes de CCC serão exploradas, permitindo ao leitor entrar em contato com novas potencialidades da operação do CCC.

## 5.2 ANÁLISE TÉCNICO ECONÔMICA

Para que um processo seja aplicável industrialmente, uma nova tecnologia deve ser lucrativa e sustentável, e, para essa avaliação, a análise técnico-econômica é fundamental. Segundo Vazzoler (2017), a análise dos custos compõe uma das partes mais importantes de qualquer projeto e indica qual o tamanho do capital a ser investido para que o produto desejado seja gerado na quantidade e qualidade esperada. Desta forma, a análise técnico-econômica permite prever se o processo em estudo é ou não industrialmente viável, vantajoso e aplicável, possibilitando a comparação das diferentes rotas e a seleção de uma rota preferencial, sendo, portanto, um guia para a escolha em relação à configuração do processo a ser desenvolvido. Nesse sentido, resultados experimentais das etapas de purificação podem servir de base para os procedimentos de simulação para verificar as avaliações econômicas e ambientais (Mussatto *et al.*, 2015).

A simulação do processo é uma ferramenta útil que pode ser utilizada para avaliar configurações alternativas e seus impactos no processo como um todo, incluindo as etapas de purificação. Além disso, permite avaliar a viabilidade industrial das tecnologias empregadas, pois esta permite a identificação de projetos com maiores chances de sucesso, rentabilidade e aplicabilidade industrial, para a seleção de inovações que possam de fato, ser voltadas à comercialização (Pinheiro *et al.*, 2006).

A estimativa para o investimento de capital e o custo de fabricação são baseados nos resultados de balanços de materiais e energia e dimensionamento de equipamentos. Para tal, o uso de ferramentas computacionais como simuladores de processos e planilhas auxiliam na obtenção de dados mais rápidos e precisos. Alguns softwares possuem uma ampla biblioteca de componentes, de propriedades e de modelos de operações unitárias que suportam a modelagem, a avaliação e a otimização de processos integrados para diversos tipos de indústrias (Petrides, 2003).

A análise técnico-econômica é utilizada para avaliar a quantidade de recursos (conjunto de equipamentos de processo, utilidades, mão de obra, materiais, entre outros) que serão necessários para construir a planta e produzir uma quantidade anual específica de produto. Questões importantes como o capital total a ser investido, o custo estimado de fabricação de um lote de produtos, o tempo para produzir um lote ou o tempo otimizado entre a produção de dois lotes consecutivos também precisam ser respondidas. À medida que o desenvolvimento do projeto avança, o mesmo ocorre com o nível de detalhe do processo. Novas questões, como aumentar o rendimento final, melhorar a qualidade do produto, aumentar a robustez e reduzir o impacto ambiental do processo, e identificar gargalos de fabricação também devem ser abordadas (Heinzle *et al.*, 2007; Petrides *et al.*, 2014). Assim, o objetivo é estabelecer um processo de produção viável e rentável.

## 5.2.1 Etapas da Análise Técnico-Econômica

Para o desenvolvimento da análise técnico-econômica, inicialmente devem ser definidas e levantadas informações básicas, porém essenciais, do processo, que conduzirão ao desenvolvimento de um primeiro modelo de fluxo de processo. Na Figura 5.1 mostramos as informações essenciais que devem ser obtidas para a construção do fluxograma que será utilizado para a análise técnico-econômica.

I. Quantidade de produto a ser fabricada anualmente (taxa de produção anual)

Deve-se considerar o tamanho do mercado atual para o produto (em escala nacional ou global) e avaliar uma meta razoável de participação no mercado do produto que será produzido (fração do mercado). Esse cálculo é essencial para a simulação da produção e para a determinação do tamanho e capacidade dos equipamentos que irão compor o processo. Em outras palavras, estabelece a escala do processo.

II. Processos fundamentais capazes de gerar o produto desejado

Como já relatado em outros capítulos deste livro, as principais características a serem consideradas para a escolha das etapas do processo de purificação se baseiam nas propriedades físicas, químicas e biológicas do produto. Dentre elas podemos destacar: massa molecular; caráter hidrofóbico/hidrofílico; afinidade por cátions, ânions, metais, epítomos ou outros ligantes; estabilidade ao pH, temperatura e íons; resistência ao cisalhamento; solubilidade em água; e, capacidade de cristalização. É baseado nessas características que são determinados os equipamentos, as condições operacionais e as matérias-primas necessárias para o processo de purificação.

III. Propriedades e os requisitos de pureza do produto desejado

No desenvolvimento do design do processo, as propriedades básicas e os requisitos de pureza do produto também são fundamentais para a seleção do tipo e número de operações de recuperação e purificação. Obviamente, dependendo da aplicação do produto, a exigência do grau

de pureza varia. Por exemplo, se o produto é uma enzima de aplicação industrial, como a amilase, utilizada para a sacarificação do amido, essa possui menor exigência de pureza que uma enzima para fins terapêuticos, como a L-asparaginase, biofármaco usado no tratamento de leucemia linfóide aguda. Neste caso, para purificação da L-asparaginase além de um alto grau de pureza (acima de 95%), é essencial uma etapa de remoção de endotoxinas. Essas características impactam no número de etapas do processo de purificação e, conseqüentemente, no rendimento final do processo, influenciando diretamente em aspectos econômicos e valor final do produto.

**Figura 5.1.** Informações essenciais que devem ser obtidas para o estabelecimento da escala, operações unitárias e número de etapas do processo, para a construção do fluxograma que será utilizado para a análise técnico-econômica.



A definição das operações unitárias e da estrutura do processo devem ser realizada com base em informações da literatura e testes experimentais, sendo possível assim, estimar as entradas, as saídas e os rendimentos de cada etapa. É criado, desta forma, um diagrama de fluxo de processo inicial (representação gráfica de todas as operações da unidade, em ordem, conectadas pelos fluxos de materiais apropriados) que pode então ser desenhado no simulador.

Os simuladores de processo são ferramentas de software que permitem ao usuário representar e analisar prontamente processos integrados. Eles estão em uso nas indústrias petroquímicas desde o início dos anos 1960. Os simuladores estabelecidos para as indústrias petroquímicas incluem: Aspen Plus (da Aspen Technology, Inc.), ChemCAD (da Chemstations, Inc.), HYSYS (da Hyprotech, Ltd./AEA Engineering Software) e PRO/II (da Simulation Sciences, Inc.). Os simuladores desenvolvidos de forma mais específica para processos bioquímicos surgiram em meados dos anos de 80. O BioProcess Simulator (BPS) (da Aspen Technology, Inc.) foi a primeira ferramenta desse tipo, seguido pelo BioPro Designer (da Intelligen, Inc.). O SuperPro Designer, uma extensão do BioPro, foi criado para abordar outras indústrias relacionadas (por exemplo, produtos farmacêuticos sintéticos, agroquímicos, processos alimentares, etc.), bem como processos de purificação de água e tratamento de resíduos. Outras ferramentas de simulação focado para bioprocessos, são o *Biotechnology Design Simulator* (BDS) (Life Sciences International, Philadelphia), o BATCHES da Batch Process Technologies (West Lafayette, In), o BioSolve Process (Biopharm Services Ltd), o Batch Plus (Aspen Technology Inc.), o BDK (Hyprotech Ltda.), entre outros. Alguns desses simuladores lidam com balanços de materiais e energia, dimensionamento e custeio de equipamentos, avaliação econômica, avaliação de impacto ambiental, programação de processos e remoção de gargalos de lotes e processos contínuos (Petrides, 2003).

Tomando como exemplo o simulador SuperPro Designer, para cada operação unitária de um processo, o simulador possui um modelo matemático capaz de executar balanços de massa e energia. O equipamento é dimensionado com bases nos balanços (Petrides *et al.*, 2014). O software também possui um extenso banco de dados de propriedades termodinâmicas e de custo. Se o usuário fornecer os componentes e os principais parâmetros de cada unidade de operação ao simulador, como composição e quantidades médias, coeficientes estequiométricos, parâmetros de centrifugação, entre outros, o programa poderá executar balanços de massa e energia durante todo o processo, para que as quantidades corretas de cada componente, em cada fluxo

de processo, sejam conhecidas. Em particular, é possível descobrir a quantidade e a concentração do produto no fluxo final. É importante ressaltar que o tamanho de cada equipamento pode ser previamente definido pelo usuário ou calculado automaticamente pelo software a partir das quantidades de matérias-primas e parâmetros de processo introduzidos pelo usuário (Ferreira *et al.*, 2020).

Através da constante troca de informações sobre o desempenho do processo calculado *in silico* e os resultados experimentais, ocorre um aprimoramento contínuo e melhoria da simulação do processo. Assim, de maneira rápida e dinâmica, diferentes cenários de processo podem ser analisados e o impacto econômico avaliado. Gargalos ou operações críticas, em termos de impacto econômico, podem ser identificados e novas soluções podem ser propostas. Os diferentes cenários e configurações do processo também podem ser analisados em termos de mitigação do impacto ambiental causado pelo processo, o que também se refletirá na redução de custos (Ferreira *et al.*, 2018; Mussatto *et al.*, 2015).

Detalhando-se as etapas e identificando as operações que representam gargalos para o processo através de simulações, é possível a rápida reavaliação e otimização do processo, por meio de diferentes configurações e/ou condições, que então podem ser testadas experimentalmente e validadas. Sob esta perspectiva, é importante o constante e estreito contato entre os envolvidos na modelagem, simulação e análise técnico-econômica com aqueles que testam as condições experimentais e avaliam a qualidade do produto, permitindo assim o desenvolvimento de um processo economicamente viável sob condições práticas de fabricação e atingindo o grau de pureza e estabilidade exigidos para o produto final (Figura 5.2). Assim, à medida que o desenvolvimento do projeto avança, o mesmo ocorre com o nível de detalhe do processo (Ferreira *et al.*, 2020). Novas questões, como aumentar o rendimento final, melhorar a qualidade do produto, aumentar a robustez e reduzir o impacto ambiental do processo, e identificar gargalos de fabricação também devem ser abordadas especificamente (Heinzle *et al.*, 2007).

Por fim é realizada a análise econômica e a validação dos resultados. Para tanto, a partir da simulação é calculada a estimativa

dos custos operacionais, custos de capital, lucros e outras informações econômicas relativas a um produto. Esses dados são essenciais para elaborar um projeto. Nesta análise, o uso de um simulador de processo também é extremamente útil, pois o software pode relacionar dados econômicos, como custos de matérias-primas, equipamentos, mão-de-obra, tratamento de resíduos, etc., com todos os dados do processo, como as quantidades de materiais e fluxos de resíduos, tipo e tamanho de cada equipamento, duração de cada operação etc. Como já relatado, os simuladores de processo geralmente têm bancos e modelos de dados econômicos embutidos. Porém é de grande importância que o usuário verifique, conclua e atualize esses dados, fornecendo os preços das matérias-primas que não estão disponíveis no programa, introduzindo taxas e impostos de mão-de-obra apropriados para o país e a indústria em consideração, ajustando os preços à inflação etc. Um parâmetro importante para avaliar economicamente um processo é o custo unitário de produção do produto final, o qual é definido como o custo operacional anual dividido pela taxa de produção anual. Como tal, não inclui diretamente os custos de capital (Ferreira *et al.*, 2020).

**Figura 5.2.** Aspectos importantes da interação entre as análises *in silico* e resultados experimentais para o desenvolvimento de um projeto economicamente viável sob condições práticas de fabricação e qualidade do produto final.



Os resultados obtidos nas simulações também podem ser utilizados para avaliar o impacto de cada etapa do processo no custo total de produção do produto, por meio da distribuição percentual de custos (*cost breakdown*). Desta forma é possível avaliar os elementos que compõem o custo do produto, possibilitando a otimização do custo e a seleção do melhor processo. Os elementos e definições utilizadas para a análise econômica estão descritos na próxima sessão.

Um resumo das etapas da análise técnico-econômica discutidas nesta seção está apresentado na Figura 5.3.

**Figura 5.3.** Etapas envolvidas na análise técnico-econômica de processos. \*Alguns softwares já possuem uma abrangente biblioteca de componentes, propriedades e modelos de operações unitárias que suportam a modelagem, avaliação e otimização de processos integrados para diversos tipos de indústrias.



## 5.2.2 Análise Econômica: Elementos e Definições

Existem dois principais elementos de uma análise econômica: a análise de custos e a análise de rentabilidade. Os custos associados a um processo são divididos em dois tipos (Heinzle *et al.*, 2007):

a) Custos de capital (CAPEX – *capital expenditure*): estão relacionados aos investimentos necessário para construção, incluindo

a compra e instalação de equipamentos, bem como a inicialização e validação da planta:

- Custos de capital direto (DFC): inclui os custos de compra e instalação de todos os equipamentos empregados no processo, como reatores, tanques de armazenamento, filtros, centrífugas e colunas cromatográficas; toda a tubulação de processo e instalação elétrica; e o custo de edifícios, engenharia e construção. O custo de compra do equipamento é bastante difícil de obter, uma vez que o instrumento geralmente é feito sob medida e os fabricantes do não fornecem seus preços abertamente. No entanto, alguns simuladores possuem modelos internos que estimam o custo do equipamento com base em suas características e tamanho (mas podem diferir significativamente dos preços reais). Os outros componentes do custo do DFC podem ser estimados multiplicando os fatores apropriados pelo custo de compra do equipamento.

- Capital de giro: corresponde ao dinheiro que a empresa precisa para manter suas operações diárias. Também pode ser estimado aplicando um multiplicador (fator de correção) ao custo do DFC.

- Custos de inicialização e validação: o processo de inicialização de uma nova planta ou processo de produção pode ser extremamente complexo e crítico, especialmente ao lidar com um procedimento novo e intrincado. Conseqüentemente, esses custos podem precisar ser levados em consideração. Eles também podem ser estimados como uma porcentagem do custo do DFC.

- Custo inicial de P&D e royalties: compreende os custos de P&D e, no caso de uso de uma patente de outra corporação ou entidade, os royalties devidos, antes do início da produção.

b) Custo operacional (OPEX – operational expenditure): estão relacionados aos custos contínuos de produção, como matérias-primas, mão-de-obra, serviços públicos, etc.

- Custos de matérias-primas: custos de todos os reagentes químicos utilizados no processo, incluindo solventes, soluções tampão e soluções de limpeza.

- Custo da mão-de-obra: compreende o custo de todo o pessoal relacionado à fabricação, principalmente aos operadores de equipamentos. Além disso, o tempo dedicado por cada operador a cada peça deve ser levado em consideração. Geralmente, é introduzida a taxa média de mão-de-obra (mais benefícios) de um operador, a partir da qual o custo das posições gerenciais e outras posições administrativas é calculado como uma porcentagem. Vale ressaltar que as taxas de mão-de-obra podem variar significativamente de país para país, e mesmo entre diferentes regiões de um único país.
- Custo de serviços públicos: envolve o custo de água do processo, eletricidade, agentes de refrigeração e aquecimento, como vapor e água resfriada. Observe que o custo da água pura para a preparação de meios de cultura, tampões cromatográficos etc. geralmente é alocado no custo das matérias-primas.
- Custo do tratamento e descarte de resíduos: envolve o custo do tratamento e descarte de resíduos aquosos e sólidos, incluindo materiais perigosos, como solventes empregados em extrações líquidas e tampões cromatográficos e materiais com risco biológico, como bolos de filtração e centrifugação. Geralmente, a cada fluxo de resíduos é atribuído um custo adequado de tratamento e disposição por unidade de volume / massa, de modo que o custo total do tratamento de resíduos seja calculado multiplicando o volume / massa total de cada fluxo de resíduos pelo custo correspondente de tratamento e disposição por unidade de volume / massa.
- Custo de consumíveis: cobre o custo de materiais sujeitos a incrustações ou danos ao longo do tempo e, portanto, devem ser descartados e substituídos periodicamente. Exemplos típicos são membranas de filtração, resinas cromatográficas e reatores descartáveis. Para calcular esse custo, é necessário determinar o custo unitário do consumível e sua frequência de substituição. As resinas cromatográficas, em particular, geralmente, são muito caras e podem ter um impacto significativo no custo de produção.

- Custo do laboratório e controle de qualidade: inclui todos os custos associados à análise off-line das propriedades físicas, químicas e biológicas do produto final, além da análise de matérias-primas e amostras intermediárias. Em geral, esse custo pode ser estimado como uma fração do custo da mão-de-obra. Em indústrias com rigorosos requisitos de qualidade e regulamentação, como a indústria farmacêutica, esse custo pode ser bastante significativo.

- Custo indireto da instalação: compreende o custo de depreciação e manutenção de equipamentos, seguros, impostos locais e outras despesas de fábrica não diretamente relacionadas à fabricação, como contabilidade, segurança, lanchonete, dentre outros. Pode ser estimado como uma porcentagem do custo de DFC.

- Diversos: abrange atividades de pesquisa e desenvolvimento, validação, marketing e vendas associadas ao bioproduto. Se o processo empregar uma patente pertencente a outra empresa ou entidade, os royalties que devem ser pagos também poderão ser incluídos neste tópico.

A análise econômica da receita gerada pelo processo depende principalmente do preço de venda do produto. Esse valor pode ser introduzido no simulador de processos, que multiplica o preço de venda pela quantidade de produto fabricado em um ano, o que se traduz na receita anual do projeto. Ao relacionar os custos e as receitas, é possível avaliar o quão viável e atraente é um bioprocessos. Alguns parâmetros comuns usados para esse fim são:

- Lucro bruto: é definido como a diferença entre a receita anual e o custo operacional anual.

- Margem Bruta: é definido como o lucro bruto dividido pela receita anual; como tal, é um número entre 0 e 1.

- Lucro líquido: é igual ao lucro bruto menos imposto de renda; a depreciação anual também pode ser adicionada ao lucro líquido.

- Retorno sobre o investimento (ROI): consiste no lucro líquido dividido pelo custo total de capital.

- Payback period: é o tempo necessário para que os custos totais de capital sejam contrabalançados pelos lucros anuais acumulados, ou seja, o ponto a partir do qual o investimento realmente começa a "ganhar dinheiro". É definido como o custo total de capital dividido pelo lucro líquido e apresentado em número de anos.
- Valor presente líquido (VPL): é valor presente do fluxo de caixa líquido do projeto em análise, descontado pelo custo médio ponderado de capital.
- Taxa interna de retorno (IRR): taxa de desconto que deve ter um fluxo de caixa para que seu VPL se iguale a zero. Ou seja, é a taxa "i" que se iguala as entradas de caixa ao valor a ser investido em um projeto.

### 5.2.3 Exemplos de Análise Técnico-Econômica das Etapas de Recuperação e Purificação de Produtos

Como já reportado, os processos de recuperação e purificação são muito variáveis, dependendo do tipo do produto, suas propriedades e grau de pureza necessários. Porém é importante destacar que cada operação unitária do processo de purificação exigirá que dados e suposições exclusivos sejam modelados e simulados. Também é importante ressaltar que a viabilidade econômica do processo de purificação depende da concentração e dos tipos de impurezas que possui o material de partida.

Trazemos como exemplos um trabalho reportado na literatura que avaliou técnico-economicamente processos de purificação de produtos farmacêuticos, no caso a uricase. Esse trabalho foi publicado por Torres-Acosta *et al.* (2016), que avaliaram a utilização de técnicas cromatográficas (composta por etapas de interação hidrofóbica DEAE-Sepharose FF, troca aniônica Phenyl-Sepharose FF e cromatografia de exclusão molecular HiloLoadTM26/60 Superdex 7) e extração em duas fases aquosas (polietilenoglicol (PEG)/sulfato de amônio (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) com e sem reciclo de PEG (polietilenoglicol).

A uricase é uma enzima utilizada como biofármaco no tratamento e prevenção da gota, a qual é uma doença inflamatória que acomete sobretudo

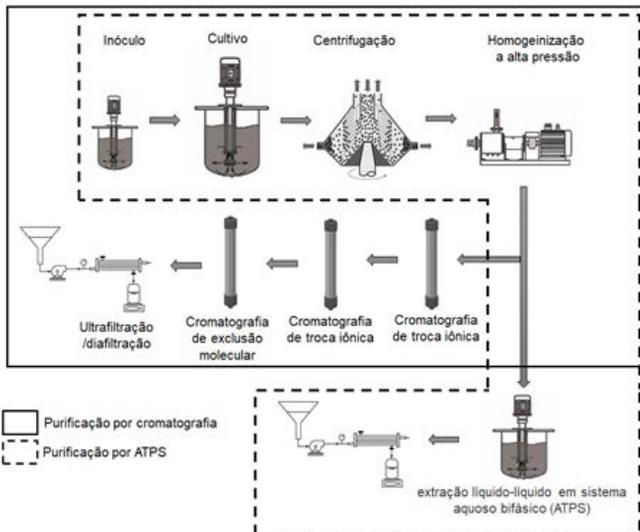
as articulações e ocorre quando a taxa de ácido úrico no sangue está em níveis acima do normal (hiperuricemia) (Nyborg *et al.*, 2016). Como biofármaco, a uricase tem sido produzida como um medicamento PEGuilado, e sua purificação é realizada através de três colunas cromatográficas sequenciais. Mais recentemente, foi relatado uma plataforma de extração líquido-líquido usando um sistema aquoso bifásico (ATPS) que poderia recuperar a uricase com alto rendimento e pureza. Foram analisadas três possíveis rotas para a produção de uricase, usando o software comercial BioSolve Process (Biopharm Services Ltd). Por meio de modelagem das diferentes configurações de estratégias de purificação relatadas para o uricase, os autores variaram os parâmetros de entrada, obtidos através de pesquisas, de modo a obter estimativas do custo de produção por grama (CoG/g). Fatores relacionados aos negócios não foram considerados.

Para comparar as técnicas, os autores começaram pela construção do fluxograma do processo. Eles então construíram dois cenários de purificação: etapas cromatográficas e ATPS. Para efeito de comparação, foram utilizados fluxos visando os mesmos níveis de produção, mas empregando as operações unitárias diferentes nos respectivos cenários (Figura 5.4). Os modelos utilizados para a simulação no software foram baseados em resultados experimentais publicados que descreveram a purificação da uricase por cromatografia (Li *et al.*, 2006) e por ATPS (Chen *et al.*, 2010). Embora o uso do ATPS possa diminuir o custo e o tempo, esta plataforma de purificação também gera uma grande quantidade de resíduo. Por isso, a capacidade de reciclar os principais componentes do ATPS também foi um cenário avaliado, baseado em trabalhos experimentais anteriores (Rito-Palomares *et al.*, 1994; Rito-Palomares & Lyddiatt, 1996).

Os parâmetros que mais afetam o CoG/g foram determinados através de análise de sensibilidade. A análise de Monte Carlo foi realizada para os cenários de cromatografia, ATPS e ATPS incorporando uma etapa de reciclagem (extração reversa), para simular o comportamento real da fabricação. Essas simulações foram realizadas para entender o quanto a distribuição de CoG/g se comporta quando a incerteza nos valores dos parâmetros do processo é considerada. Assim, pôde-se analisar o impacto da alteração do método de purificação e,

posteriormente, a adição de uma operação de unidade para reciclagem de PEG na economia geral do processo. Os autores observaram que o ATPS é muito mais barato que as técnicas cromatográficas. Contudo, existe uma área em que o custo de produção dos dois bioprocessos se sobrepõe, utilizando o modelo acima descrito, quando o processo de cromatografia é operado nos 23% superiores de todos os valores possíveis obtidos sob a função probabilística, enquanto o ATPS precisa operar em os 52% inferiores (tendo em conta o valor ótimo). Além disso, verificou-se que a reciclagem não afetou o custo de produção. Essa opção diminuiu a quantidade de materiais necessários, mas o CoG/g não diminuiu significativamente devido ao aumento dos custos operacionais da unidade, que refletem os altos volumes de material que precisam ser processados nessa opção de processo. Eles demonstraram na modelagem que quando a concentração e o rendimento do processo de downstream aumentam, o CoG/g diminui, o que destaca a importância da otimização das etapas de purificação para o valor final do produto.

**Figura 5.4.** Bioprocessos projetados para a produção de uricase. Processo cromatográfico convencional - processo usando ATPS. Fonte: Torres-Acosta *et al.*, 2016 (adaptado).



Nesse estudo fica explicitado como a modelagem econômica é uma ferramenta poderosa que permite a comparação de possíveis resultados e encontrar áreas onde mais pesquisas ou otimizações podem ser necessárias sem o recurso a extensos experimentos e tempo.

## 5.3 CROMATOGRAFIA EM CONTRACORRENTE

A cromatografia em contracorrente (CCC) é uma técnica de cromatografia de partição líquido-líquido. O processo de partição ocorre em uma coluna, um tubo oco ou uma série de câmaras ligadas com microcanais, onde uma fase (a móvel) flui continuamente pela outra (fase estacionária), que é permanentemente retida na coluna com o auxílio de uma força gravitacional ou centrífuga e configuração específica da coluna. Pelo motivo de nenhum suporte sólido ser usado, a CCC pode dispensar muitos dos inconvenientes resultantes do uso de um suporte sólido de técnicas convencionais de CL, como: perda de amostra por adsorção com a coluna, “tailing” de picos de soluto, contaminação com compostos retidos no suporte sólido (fase estacionária), baixa capacidade da coluna, dificuldade de escalonamento, prazo de validade curto e alto preço das colunas. Além disso, a CCC é uma técnica muito mais versátil, pois as duas fases líquidas podem ser móveis e a fase móvel pode até ser alterada durante uma operação de purificação se os componentes injetados forem retidos por muito tempo na coluna. Na CCC, também é possível prever o volume de retenção dos analitos, aumentando a simplicidade do uso deste equipamento com a utilização reduzida de solventes e um baixo custo operacional. Um baixo consumo de solvente em comparação às técnicas de CL, torna a técnica de CCC mais sustentável.

A maior desvantagem desta técnica cromatográfica líquido-líquido é, no entanto, a necessidade de otimização das condições de separação para cada nova amostra. As características distintivas da CCC são descritas na Tabela 5.1 por meio de uma comparação em termos de vantagens e desvantagens com a CL. Com relação à análise de amostras, a CCC permite o acoplamento com muitos instrumentos analíticos (exemplos: espectroscopia UV/Vis; cromatografia líquida de

alta eficiência com detector de arranjo de diodo e espectrometria de massa), estabelecendo assim sistemas de detecção on-line das amostras. A infinidade de potencialidades desta técnica cromatográfica líquido-líquido levou ao interesse da comunidade acadêmica e da indústria na purificação de um grande número de compostos bioativos, incluindo produtos farmacêuticos, proteínas/peptídeos, enantiômeros, alcaloides, flavonoides e fenóis (Jeon e Kim, 2013; Li *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2009; Michel *et al.*, 2014; Santos *et al.*, 2018).

**Tabela 5.1.** Comparação da técnica de CCC com a cromatografia líquida (CL) com suporte sólido, em termos de vantagens e desvantagens.

Cromatografia em Contracorrente (CCC)	
Vantagens em comparação com CL com suporte sólido	Desvantagens em comparação com CL com suporte sólido
<b>Econômica</b> - não há necessidade de comprar colunas preparativas novas e caras, são utilizados solventes mais baratos (na maioria dos casos, o “grau analítico” é adequado para um bom desempenho de separação). Menor custo operacional, pois permite a injeção direta do extrato bruto sem a necessidade de pré-tratamento.	<b>Pouco descrita na literatura</b> - a técnica ainda não é amplamente conhecida como outras técnicas cromatográficas.
<b>Não há perdas significativas</b> - sem adsorção irreversível ou perda de amostra: valores de recuperação na ordem de $\approx 100\%$ são obtidos.	<b>Processo demorado para otimizar</b> - é necessário fazer uma triagem adequada de vários sistemas de solventes em sistemas de extração líquido-líquido antes de aplicar na CCC.
<b>Eficiente</b> - elevados níveis de purificação são atingidos, chegando a 99,9%.	<b>Problemas de resolução</b> - a CCC exibe uma resolução cromatográfica mais baixa em comparação com alguns cromatógrafos semipreparativos (exemplos: HPLC ou FPLC).
<b>Versátil</b> - adaptada a todos os tipos de amostras de origem natural ou sintética / bem adaptados a uma ampla gama de polaridades de solutos e solventes.	-

Cromatografia em Contracorrente (CCC)	
Vantagens em comparação com CL com suporte sólido	Desvantagens em comparação com CL com suporte sólido
<b>Maior capacidade de amostra</b> – permite a injeção de amostras muito concentradas com baixo risco de sobrecarga da fase estacionária (líquida).	-
<b>Fácil escalonamento</b> – a separação / purificação pode ser adaptada ao processamento de amostras que variam de mg a vários kg.	-

O volume de trabalho de uma coluna de CCC (VC) consiste na soma dos volumes de fase móvel (VM) com a fase estacionária (VS), como se pode ver na Equação 5.1:

$$V_C = V_M + V_S \quad (5.1)$$

O mecanismo de partição do soluto em CCC é baseado no coeficiente de partição de um determinado soluto (KD) num sistema bifásico líquido-líquido usado na separação de compostos, sendo o único parâmetro não volumétrico usado na equação de volume de retenção (VR) (Equação 5.2):

$$V_R = V_M + K_D V_S \quad (5.2)$$

Como já mencionado na Tabela 1, o escalonamento na CCC é direto. Por meio da Equação 2, o volume de retenção da amostra pode ser calculado com confiabilidade, caso os parâmetros de volume da coluna, volume da fase móvel e estacionária e coeficiente de partição do soluto sejam conhecidos. A maioria das equações clássicas usadas CL são

aplicáveis na CCC, como o fator de retenção ( $k$ ), fator de separação ( $\alpha$ ), resolução de pico ( $R_S$ ) e número de pratos teóricos ( $N$ ). Combinando as equações, pode-se estabelecer que a equação de resolução de pico no CCC é pode ser representada pela Equação 5.3.

$$R_S = \frac{\sqrt{N}}{4} \frac{(K_{D2} - K_{D1})}{\left[ \frac{V_{M1}}{V_S} + \frac{(K_{D1} + K_{D2})}{2} \right]} \quad (5.3)$$

Um dos parâmetros mais importantes a ser calculado na CCC é a taxa de retenção de volume da fase estacionária ou a razão em volume de fase estacionária ( $S_F$ ). Este parâmetro é definido como a razão entre o volume da fase estacionária líquida e o volume da coluna, conforme representado na Equação 5.4:

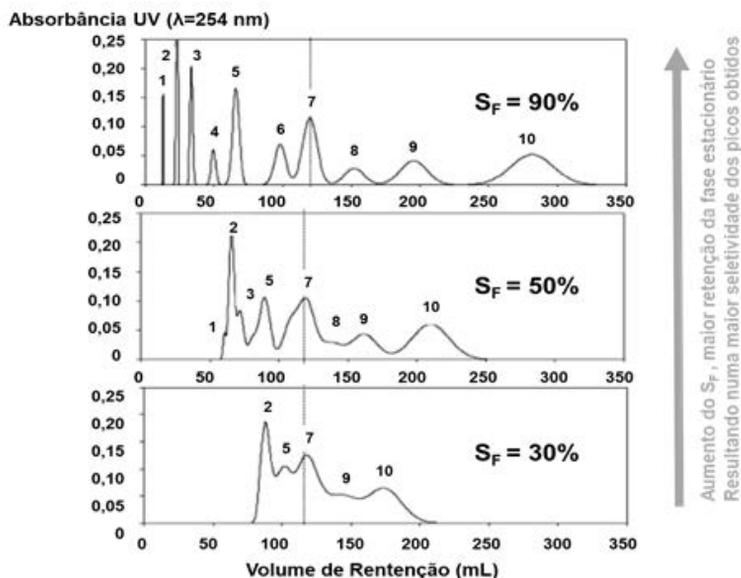
$$S_F = \frac{V_S}{V_C} \quad (5.4)$$

Assim sendo,  $S_F$  expressa a razão volumétrica da coluna de CCC que está ocupada com fase estacionária e deverá ser expressa em porcentagem (%). Como parâmetro adimensional, o  $S_F$  é usado para avaliar a capacidade de retenção da fase estacionária de diferentes equipamentos e solventes de CCC usados como fases móvel e estacionária. Existe uma clara correlação entre a resolução de pico e o valor  $S_F$ , como pode ser visto na Equação 5.5:

$$R_S = S_F \frac{\sqrt{N}}{4} \frac{(K_{D2} - K_{D1})}{\left[ 1 - S_F \left( 1 - \frac{(K_{D1} + K_{D2})}{2} \right) \right]} \quad (5.5)$$

Portanto, um baixo valor de  $S_F$  reflete em uma pequena quantidade de fase estacionária retida na coluna CCC, resultando em uma menor resolução do pico cromatográfico, sendo um sinal de desempenho de uma purificação ineficaz. Por outro lado, quanto maior  $S_F$ , maior a resolução de um pico cromatográfico, como pode ser observado na Equação 5.5 e Figura 5.5. O volume de fase estacionária deve ser maximizado para aumentar a resolução do pico.

**Figura 5.5.** Comparação dos cromatogramas obtidos com a mesma coluna de CCC hidrodinâmica e sistema líquido bifásico, aplicando uma amostra com 10 compostos. O volume de fase estacionária retida diminuí de 108 mL ( $S_F = 90\%$ ) para 36 mL ( $S_F = 30\%$ ), sendo que o volume da coluna ( $VC = 120$  mL). Fonte: Oliveros *et al.*, 2002 (adaptado).

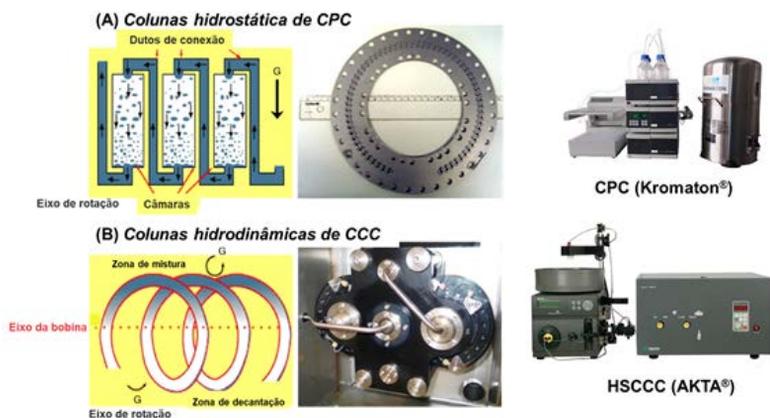


Dos inúmeros projetos de colunas usados para reter uma fase estacionária líquida, apenas dois foram desenvolvidos comercialmente pelo seu grande potencial e usabilidade, sendo as configurações hidrostática e hidrodinâmica (Figura 5.6).

- Coluna CCC hidrostática ou CPC: Os estágios iniciais das colunas hidrostáticas de CCC eram conhecidos como cromatografia em contracorrente de gotícula (DCCC), que usavam exclusivamente a gravidade para manter a fase estacionária líquida, levando a tempos de eluição extremamente longos (dias). Esse tipo de coluna não é mais usado e foi substituído por modernas colunas CCC hidrostáticas comercializadas sob o nome de cromatografia de partição centrífuga (CPC). Suas principais características são: (i) o eixo de rotação único gerando um campo centrífugo constante; e, (ii) volumes geométricos fechados, tubos, microcanais e/ou câmaras que se repetem através da conexão de tubos, formando um padrão. Esse projeto (desenho) reduz o tempo de contato para troca de solutos com a fase estacionária e cria uma pequena pressão hidrostática. As centrífugas hidrostáticas contêm duas vedações rotativas e esse tipo de equipamento é moderadamente silencioso para operar (produzindo mais ruído quando a força centrífuga é aplicada) (Marchal *et al.*, 2003).

-Coluna hidrodinâmica de CCC ou HSCCC: As centrífugas hidrodinâmicas usadas nas colunas da CCC têm dois eixos de rotação, diferente das colunas da CCC hidrostática e têm funções diferenciais. O eixo principal é designado de eixo rotação e o planetário corresponde ao eixo de revolução, o qual gera um campo de força centrífuga variável. O número de eixos planetários pode ser variável, porém os mais comuns são eixos simples, duplos e triplos. Cada eixo planetário possui uma bobina ou carretel montado que contém as bobinas dos tubos de Teflon enrolados continuamente. Para colunas hidrodinâmicas, existem alguns parâmetros importantes a serem observados, como a razão (razão beta,  $\beta r$ ) do raio da bobina ( $r$ ) sobre o raio do rotor ( $R$ ). A tubulação pode ser conectada do lado de fora da centrífuga, enrolada em volta das bobinas e passada para o exterior novamente sem vedações rotativas, sendo equivalente a uma coluna contínua fina e longa. O campo de força variável produz zonas de mistura e sedimentação em todo o comprimento da coluna em espiral, sem aumento significativo da pressão. As colunas hidrodinâmicas são mais ruidosas devido ao conjunto de engrenagens, que pode ser reduzido nos equipamentos mais modernos. Essas colunas são chamadas de CCC de alta velocidade (HSCCC) (Berthod, 2007).

**Figura 5.6.** Colunas usadas em Cromatografia em Contracorrente: (A) colunas hidrostáticas de CPC e (B) colunas hidrodinâmicas de HSCCC, representação das colunas e dois exemplos existentes no mercado. Fonte: Berthod, 2007 (adaptado).



A Tabela 5.2 compara os recursos desses dois tipos de colunas de CCC. Convém destacar que não há um tipo de coluna superior, pois depende da matriz da amostra e do sistema líquido-líquido a ser aplicado.

O método de eluição clássica consiste na formulação e equilíbrio de um sistema bifásico seguido pela separação das fases correspondentes às fases estacionária e móvel. A coluna é então preenchida com a fase estacionária, posteriormente equilibrada com a rotação, e a fase móvel é bombeada. Com o sistema equilibrado, a amostra é introduzida e a eluição continua até que todos os analitos de interesse tenham sido eluídos (Friesen *et al.*, 2015). No entanto, os analitos altamente retidos levam muito tempo para serem eluídos, o que requer um grande volume de solvente e os analitos eluídos mais rapidamente não são bem resolvidos (Friesen *et al.*, 2015). Portanto, vários métodos alternativos de eluição foram desenvolvidos para superar os problemas associados aos analitos altamente retidos. A Tabela 5.3 resume os métodos alternativos de eluição que estão sendo desenvolvidos, como eluição-extrusão, “back-extraction” ou modo duplo. Esses métodos só são possíveis por causa da natureza líquida das duas fases cromatográficas

líquidas, possibilitando a introdução da fase "estacionária" como parte do protocolo cromatográfico (Berthod *et al.*, 2003).

**Tabela 5.2.** Comparação de vários tipos de colunas usadas no regime de purificação por cromatografia em contracorrente (CCC).

<b>Cromatografia</b>	<b>Regime</b>	<b>Vantagens</b>	<b>Desvantagens</b>
Partição centrífuga (CPC)	Hidrostático	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Versatilidade para trabalhar nos modos ascendente e descendente</li> <li>- Técnica escalonável</li> <li>- Maior versatilidade de solventes que podem ser usados como fase móvel e estacionária (podem ser utilizados sistemas aquosos bifásicos)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Problemas operacionais usando solventes com viscosidade média e alta</li> <li>- Lubrificação de selos rotativos a cada 100 horas (manutenção)</li> <li>- Método de purificação demorado</li> <li>- Menos eficiente (menor número de pratos teóricos)</li> </ul>
Alta velocidade (HSCCC)	Hidrodinâmico	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Maior eficiência e resolução na separação de diversas biomoléculas</li> <li>- Tempos operacionais mais curtos</li> <li>- Técnica de escalonável</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Engrenagem barulhenta</li> <li>- Conexão do tubo deve ser trocado a cada 100 h (manutenção)</li> <li>- Problemas com retenção de fase estacionária (Sf) e viscosidade das fases</li> </ul>

## 5.4 MÉTODOS DE ELUIÇÃO EM CROMATOGRAFIA EM CONTRACORRENTE

O método de eluição clássico consiste na formulação e equilíbrio de um sistema bifásico seguido pela separação das fases correspondentes às fases estacionária e móvel. A coluna é então preenchida com a fase estacionária, posteriormente equilibrada com a rotação, e a fase móvel é bombeada. Com o sistema equilibrado, a amostra é introduzida e a eluição continua até que todos os analitos de interesse tenham sido eluídos (Friesen *et al.*, 2015). No entanto, os analitos altamente retidos levam muito tempo para serem eluídos, o que requer um grande volume de solvente e os analitos eluídos mais rapidamente não são bem resolvidos (Friesen *et al.*, 2015). Portanto, vários métodos alternativos de eluição foram desenvolvidos para superar os problemas associados aos analitos altamente retidos. A Tabela 5.3 resume os métodos alternativos de eluição que estão sendo desenvolvidos, como eluição-extrusão, “back-extraction” ou modo duplo. Esses métodos só são possíveis por causa da natureza líquida das duas fases cromatográficas líquidas, possibilitando a introdução da fase “estacionária” como parte do protocolo cromatográfico (Berthod *et al.*, 2003).

**Tabela 5.3.** Resumo dos métodos de eluição por cromatografia em contracorrente (Friesen *et al.*, 2015).

Método de eluição	Mudança de fase	Mudança de direção do fluxo	Mudança de direção de rotação	Observações
Clássico	-	-	-	Os analitos altamente retidos permanecem na fase estacionária
Eluição-extrusão	Uma	-	-	Os analitos eluem na ordem de valores $K_D$ .

Método de eluição	Mudança de fase	Mudança de direção do fluxo	Mudança de direção de rotação	Observações
Back-extraction	-	Uma	-	A ordem de eluição é revertida; alguns analitos podem eluir em volumes separados.
Back-step	Duas	-	-	Uma porção de fase aquosa introduzida para eluir analitos altamente retidos
Modo duplo	Uma	Uma	-	A ordem de eluição reverte
Rotação dupla	Uma	-	Uma	A ordem de eluição reverte
Modo múltiplo	Múltipla	Múltipla	-	A ordem de eluição reverte cada ciclo
Intermitente	Múltipla	Múltipla	-	Os loops de amostra estão no meio de uma única coluna ou entre duas colunas

## 5.5 APLICAÇÕES DE CCC NA PURIFICAÇÃO DE PRODUTOS FARMACÊUTICOS E BIOMOLÉCULAS

Sendo um sistema de cromatografia líquido-líquido, o CCC pode selecionar dentre uma gama quase infinita de possíveis sistemas de solventes bifásicos para uma dada purificação. De fato, existem muitos artigos científicos a respeito da separação de compostos naturais de biomassas complexas usando CCC (Friesen *et al.*, 2015; Lu *et al.*, 2009; Wanasundara e Fedec, 2002). No entanto, para obter os resultados esperados, os parâmetros de análise apropriados devem ser escolhidos, como o tipo das misturas bifásicas, vazão da fase móvel e velocidade de rotação do rotor (Melorose *et al.*, 2015). Além disso, os compostos presentes na matriz biológica ou sintética devem ser solúveis nas fases móvel e estacionária. O solvente mais eficiente é uma combinação desse tipo, no qual os coeficientes de partição (KD, razão da concentração de soluto na fase estacionária e da fase móvel) de um composto escolhido variam entre 0,4 e 2,5 - "ponto ideal" (Berthod *et al.*, 2003). Um menor valor KD resulta em perda de resolução de pico, enquanto um valor maior leva a uma alta diluição dos compostos eluídos (Conway, 1991). Assim, é desejável selecionar o sistema de solvente bifásico para que os coeficientes de partição dos compostos-alvo estejam no ponto ideal, a fim de obter alta produtividade e resolução suficiente (Berthod, 2003). Geralmente, diferenças entre os valores de KD dos analitos a separar de 0,2 são adequadas para a resolução de picos. Além disso, a regra geral da condição de particionamento é ajustar a polaridade do solvente do sistema adequadamente à polaridade dos compostos-alvo (Melorose, 2015).

Os solventes são escolhidos também considerando outros parâmetros, como a diferença de densidade entre as duas fases líquidas, a viscosidade do líquido ou a tensão interfacial (Berthod, 2007). Para determinar os solventes apropriados, é necessário o método de cromatografia em camada fina (TLC) e isso pode ser feito correndo a amostra em uma placa de sílica com diferentes solventes (Hawker, 2009). Os solventes que apresentam fator de retenção na faixa de 0,4 a 0,6 são os mais adequados para a análise de CPC (Li *et al.*, 2011).

Além da seleção apropriada de solventes, também é importante definir a vazão correta e a velocidade de rotação do rotor. A redução da vazão melhora a resolução do pico e aumenta o número de pratos teóricos. A velocidade do rotor mínima necessária para um SF adequado, permite uma resolução satisfatória. Além disso, o desempenho da separação depende fortemente do volume da fase estacionária que pode ser mantido dentro da coluna (Lu *et al.*, 2008). Um maior volume de fase estacionária leva a uma maior resolução de separação. Devido à baixa tensão interfacial e à natureza bastante viscosa dos sistemas aquosos bifásicos em comparação com os solventes orgânicos, tem sido um desafio obter alta retenção de fase estacionária a taxas de fluxo razoáveis nas colunas convencionais de CCC e CPC.

As aplicações em CCC para o fracionamento e purificação de diversos produtos farmacêuticos e biomoléculas têm sido bastante amplas. Um dos principais produtos purificado em CCC são produtos naturais provindos de plantas e biomassa, sendo principalmente utilizado sistemas com fases orgânicas (Destandau *et al.* 2015; Kim *et al.*, 2011; Friesen *et al.* 2015). As aplicações na purificação de compostos quirais por CCC é também outro importante alvo de estudo (Foucault, 2001). As purificações mais relatadas na literatura estão concentradas na utilização de compostos de polaridade intermediária. No entanto, o HSCCC e o CPC, podem ser particularmente úteis para purificações na faixa de extremidade polar e apolar (Bojczuk *et al.*, 2017). A separação de diversas biomoléculas como proteínas e biofármacos proteicos (Santos *et al.*, 2019) pode ser também efetuada com sucesso em CCC usando sistemas aquosos bifásicos, neste caso usando sobretudo a técnica de CPC. Mostraremos um exemplo de purificação em CPC de biofármacos PEGuilados, mais especificamente citocromo-c PEGuilado, para esse fim foi feito inicialmente uma triagem de diferentes sistemas aquosos bifásicos compostos por polietileno glicol (PEG) e tampão fosfato de potássio (pH=7), onde se variou a massa molecular do PEG (PEG 600, PEG 1000, PEG 1500, PEG 2000 e PEG 4000) de forma a entender qual o melhor sistema a aplicar em CPC (Santos *et al.*, 2019). Os sistemas com baixa massa molecular não se mostraram eficientes em CPC, dado que a densidade das fases aquosas de topo e fundo é similar, desta forma o SF mostrou ser muito baixo, o que não é desejável para obter purificações com alta resolução. Já

o PEG com massa molecular acima de 2000 não se mostrou eficiente, pois a fase polimérica é muito densa e houve impedimento de ser aplicada em CPC por problemas de pressão (limitação do equipamento). Foram obtidas recuperações do produto PEGuilado entre 88-100% e purezas de 100%, evidenciando a elevada capacidade de resolução e purificação de produtos farmacêuticos utilizando esta plataforma de *downstream*.

## 5.6 CONCLUSÕES

Neste capítulo foram abordados os conceitos básicos para a realização da análise técnico-econômica de um determinado bioprocessos de forma a garantir ao leitor as ferramentas-chave para prever a viabilidade e emprego em escalonamento do mesmo. Diversos *softwares* são sugeridos, bem como o procedimento *in silico* para a determinação deste tipo de análises, culminando na identificação dos principais gargalos ou operações críticas e permitindo melhorar e otimizar o processo em questão. Um exemplo de um processo real para o caso de purificação da uricase por duas técnicas de purificação distintas: cromatografia e sistemas aquosos bifásicos foi explorado de forma a sistematizar os conceitos deste tópico numa abordagem prática. A cromatografia em contracorrente (CCC) é uma das técnicas de purificação mais inovadoras e com um crescente interesse na indústria farmacêutica e nutracêutica, a potencialidade desta tecnologia no contexto de purificação de fármacos e bioprodutos foi abordada neste capítulo. Os dois tipos principais de colunas e plataformas em CCC, especificamente cromatografia de partição centrífuga (CPC) e CCC de alta velocidade (HSCCC), aliado aos diferentes tipos de operação desta técnica permitem uma elevada versatilidade e eficiência de fracionamento de biomoléculas de misturas complexas. Para além disso, devido à característica do CCC sendo uma cromatografia líquido-líquido sem suporte sólido, a percentagem de perdas é mínima, sendo obtidos rendimentos próximo do 100%, esta é uma das principais vantagens face à cromatografia líquida com suporte sólido, exemplo HPLC. Um exemplo de purificação em CCC foi dado neste capítulo evidenciando a aplicação desta técnica no ramo da biotecnologia, neste caso na purificação de biofármacos PEGuilados.



# LEITURA COMPLEMENTAR

Para o leitor interessado numa revisão dos conceitos básicos sobre análise técnico-econômica de bioprocessos, para a correta compreensão dos princípios que fundamentam os procedimentos, sugere-se a leitura das seguintes publicações:

Harrison, R.G., Todd, P.W., Rudge, S.R., Petrides, D. Bioprocess Design and Economics, In: Bioseparations science and engineering, Oxford University Press, Oxford, New York, 2015.

Heinzle, E., Biber, A.P., Cooney, C.L. Development of sustainable bioprocesses: Modeling and Assessment. John Wiley & Sons, New York, 2006.

Já aqueles também interessados nos conceitos de cromatografia contracorrente podem encontrar mais informações relacionados ao seu uso na referência abaixo apresentada

Berthod, A. Countercurrent chromatography and the journal of liquid chromatography: A love story. Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies. 30: 1447-1463, 2007.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Fundação de Pesquisa de São Paulo (FAPESP) [Projeto 2017/21819-9 e 2018/25994-2], pelo apoio financeiro.

## REFERÊNCIAS

- Berthod, A. Counter current chromatography and the Journal of Liquid Chromatography: A love story. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*. 30: 1447-1463, 2007.
- Berthod, A., Ruiz-Angel, M.J., Carda-Broch, S. Elution-extrusion countercurrent chromatography. Use of the liquid nature of the stationary phase to extend the hydrophobicity window. *Analytical Chemistry*. 75: 5886–5894, 2003.
- Bojczuk, M., Żyźelewicz, D., Hodurek, P. Centrifugal partition chromatography – A review of recent applications and some classic references. *Journal of Separation Science*. 40: 1597-1609, 2017.
- Buyel, J.F., Fischer, R. Downstream processing of biopharmaceutical proteins produced in plants: The pros and cons of flocculants. *Bioengineered*. 5: 138–142, 2014.
- Chen, Y., Meng, Y.F., Tang, J.B., Sun, T.Y., Sun, F.X., Liang, S.J. Extraction of uricase from *Candida utilis* by applying polyethylene glycol (PEG)/(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> aqueous two-phase system. *African Journal of Biotechnology*. 9: 4788–4795, 2010.
- Conway, W.D. Counter-current chromatography: Preface. *Journal of Chromatography*. 538: 1, 1991.
- Destandau, E., Boukhris, M.A., Zubrzycki, S., Akssira, M., Rhaffari, L.E., Elfakir, C. Centrifugal partition chromatography elution gradient for isolation of sesquiterpene lactones and flavonoids from *Anvillea radiata*. *Journal of Chromatography B*. 985: 29–37, 2015.
- Ferreira, R da G., Fuganholi, N. S., Brumano, L. P., Azzoni, A. R. Freitas, S. Techno-economic Evaluation of Biotechnological Processes and Pharmacoeconomic Analysis. São Paulo. Edgard Blucher, 2021.

Ferreira, R.G., Azzoni, A.R., Freitas, S. Techno-economic analysis of the industrial production of a low-cost enzyme using *E. coli*: the case of recombinant  $\beta$ -glucosidase. *Biotechnology. Biofuels*. 11: 1-13, 2018.

Foucault, A.P. Enantioseparations in counter-current chromatography and centrifugal partition chromatography. *Journal of Chromatography A*. 906: 365-378, 2001.

Friesen, J.B., McAlpine, J.B., Chen, S.N., Pauli, G.F. countercurrent separation of natural products: An update. *Journal of Natural Products*. 78: 1765–1796, 2015.

Hawker, C.D. Countercurrent Chromatography and Countercurrent Distribution. *JALA - Journal of the Association for Laboratory Automation*. 14: 242, 2009.

Heinzle, E., Biber, A.P., Cooney, C.L. *Development of Sustainable Bioprocesses: Modeling and Assessment*. New York: John Wiley & Sons, 2006. 285 p.

Jeon, J.S., Kim, C.Y. Preparative separation and purification of flavonoids and stilbenoids from *Parthenocissus tricuspidata* stems by dual-mode centrifugal partition chromatography. *Separation and Purification Technology*. 105: 1–7, 2013.

Kim, S.M., Shang, Y.F., Um, B.H. A preparative method for isolation for fucoxanthin from *Eisenia bicyclis* by centrifugal partition chromatography. *Phytochemical Analysis*. 22: 322-329, 2011.

Li, H.B., Chen, F. Separation and purification of epimedin A, B, C, and icariin from the medicinal herb *epimedium Brevicornum maxim* by dual-mode HSCCC. *Journal of Chromatographic Science*. 47: 337–340, 2009.

Li, J., Chen, Z., Hou, L., Fan, H., Weng, S., Xu, C., Ren, J., Li, B., Chen, W. High-level expression, purification, and characterization of non-

tagged *Aspergillus flavus* urate oxidase in *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification*. 49: 55–5., 2006.

Li, S.C., He, S., Zhong, S., Duan, X., Ye, H., Shi, J., Peng, A., Chen, L. Elution-extrusion counter-current chromatography separation of five bioactive compounds from *Dendrobium chrysototxum* Lindl. *Journal of Chromatography A*. 1218: 3124–3128, 2011.

Liu, D., Su, Z., Wang, C., Gu, M. Separation of five isomers of dihydroxybenzoic acid by high-speed counter-current chromatography with dual-rotation elution method. *Journal of Chromatographic Science*. 47: 345–348, 2009.

Lu, Y., Liu, R., Berthod, A., Pan, Y. Rapid screening of bioactive components from *Zingiber cassumunar* using elution-extrusion counter-current chromatography. *Journal of Chromatography A*. 1181: 33–44, 2008.

Lu, Y., Ma, W., Hu, R., Berthod, A., Pan, Y. Rapid and preparative separation of traditional Chinese medicine *Evodia rutaecarpa* employing elution-extrusion and back-extrusion counter-current chromatography: Comparative study. *Journal of Chromatography A*. 1216: 4140–4146, 2009.

Marchal, L., Legrand, J., Foucault, A. Centrifugal partition chromatography: A survey of its history, and our recent advances in the field. *Chemical Record*. 3: 133–143, 2003.

Meitz, A., Sagmeister, P., Langemann, T., Herwig, C. An integrated downstream process development strategy along QbD principles. *Bioengineering*. 1: 213–230, 2014.

Melrose, J., Perroy, R., Careas, S. Introduction to centrifugal partition chromatography CPC/CCC. *Statewide Agricultural Land Use Baseline 2015*, v. 1, 2015.

Michel, T., Destandau, E., Elfakir, C. New advances in countercurrent chromatography and centrifugal partition chromatography: Focus on coupling strategy. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 406: 957–969, 2014.

Murayama, W., Kobayashi, T., Kosuge, Y., Yano, H., Nunogaki, Y., Nunogaki, K. A new centrifugal counter-current chromatograph and its application. *Journal of Chromatography A*. 239: 643–649, 1982.

Mussatto, S.I., Aguiar, L.M., Marinha, M.I., Jorge, R.C., Ferreira, E.C. Economic analysis and environmental impact assessment of three different fermentation processes for fructooligosaccharides production. *Bioresource Technology*. 198: 673–681, 2015.

Nyborg, A.C., Ward, C., Zacco, A., Chacko, B., Grinberg, L., Geoghegan, J.C., Bean, R., Wendeler, M., Bartnik, F., O'Connor, E., Gruia, F., Iyer, V., Feng, H., Roy, V., Berge, M., Miner, J.N., Wilson, D.M., Zhou, D., Nicholson, S., Wilker, C., Wu, C.Y., Wilson, S., Jermutus, L., Wu, H., Owen, D.A., Osbourn, J., Coats, S., Baca, M. A Therapeutic uricase with reduced immunogenicity risk and improved development properties. *PLoS One*. 11: e0167935, 2016.

Oliveros, L., Minguillón, C., Franco, P., Foucault, A.P. Countercurrent Chromatography. 38: 331-351, 2002.

Petrides, D. Bioprocess Design and Economics, in: HARRISON, R.G., TODD, P.W., RUDGE, S.R., Petrides, D. (Eds.), *Bioseparations Science and Engineering*. Oxford University Press, Oxford, NY, p. 1–60, 2003.

Petrides, D., Carmichael, D., Siletti, C., Koulouris, A. biopharmaceutical process optimization with simulation and scheduling tools. *Bioengineering*. 1; 154–187, 2014.

Pinheiro, A.A., Siani, A.C., Guilhermino, J.F., Henriques, M.G.M.O., Quentel, C.M., Pizarro, A.P.B. Metodologia para gerenciar projetos

de pesquisa e desenvolvimento com foco em produtos: uma proposta. *Revista de Administração Pública*. 40: 457–478, 2006.

Rito-Palomares, M., Huddleston, J.G., Lyddiat, A. PEG phosphate aqueous two-phase partition - polymer recycling in practical implementation. *Food Bioproducts Process*. 72: 11–13, 1994.

Rito-Palomares, M., Lyddiat, A. Impact of cell disruption and polymer recycling upon aqueous two-phase processes for protein recovery. *J. Chromatography B*. 680: 81–89, 1996.

Santos, J.H.P.M., Almeida, M.R., Martins, C.I.R., Dias, A.C.R.V., Freire, M.G., Coutinho, J.A.P., Ventura, S.P.M. Separation of phenolic compounds by centrifugal partition chromatography. *Green Chemistry*. 20: 1906–1916, 2018.

Santos, J.H.P.M., Ferreira, A.M., Almeida, M.R., Quinteiro, P.S.G.N., Dias, A.C.R.V., Coutinho, J.A.P., Freire, M.G., Rangel-Yagui, C.O., Ventura, S.P.M. Continuous separation of cytochrome-c PEGylated conjugates by fast centrifugal partition chromatography. *Green Chemistry*. 21: 5501–5506, 2019.

Torres-Acosta, M.A., Aguilar-Yáñez, J.M., Rito-Palomares, M., Titchener-Hooker, N.J. Economic analysis of uricase production under uncertainty: Contrast of chromatographic purification and aqueous two-phase extraction (with and without PEG recycle). *Biotechnology Progress*. 32: 126–133, 2016.

Tundisi, L.L., Coêlho, D.F., Zanchetta, B., Moriel, P., Pessoa, A., Tambourgi, E.B., Silveira, E., Mazzola, P.G. L-Asparaginase purification. *Separation and Purification Review*. 46: 35–43, 2017.

Vazzoler, A. Introdução ao estudo das viabilidades técnica e econômica de processos químicos: Estimativas de custos para projetos conceituais e anteprojetos. Campinas: Edição do autor, 2017. 486 p.

Wanasundara, U., Fedec, P. Centrifugal partition chromatography (CPC): Emerging separation and purification technique for lipid and related compounds. *INFORM - International News on Fats, Oils and Related Materials*. 13: 726–730, 2002.

# 6

## **Desenvolvimento de processos de produção de biofármacos de acordo com Quality by Design (QbD)**

**Francisco Vitor Santos da Silva<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Departamento de Tecnologia Bioquímica-Farmacêutica. Laboratório de Biotecnologia Farmacêutica. Universidade de São Paulo – Av. Prof. Lineu Prestes 580, Butantã. São Paulo-São Paulo, Brasil. 05508-000.



# RESUMO

Este capítulo irá explorar o desenvolvimento de processos de produção de biofármacos de acordo com a filosofia *Quality by Design* (QbD ou “Qualidade por Projeto”). Inicialmente, serão explorados o contexto comercial e o cenário regulatório que levaram as principais agências reguladoras internacionais a promoverem QbD como estratégia de desenvolvimento de processos de produção de medicamentos. Em seguida, o passo-a-passo do desenvolvimento de processos de acordo com QbD será explicado com foco em substâncias farmacológicas ativas de origem biotecnológica (biofármacos), incluindo o conceito de Espaço de Projeto (Design Space), Tecnologia Analítica de Processos (*Process Analytical Technology*, ou PAT), assim como planos de gerenciamento do ciclo de vida de produtos farmacêuticos. Por fim, neste capítulo será também abordado como estes conceitos se aplicam no contexto regulatório brasileiro na esperança de que mais ferramentas de QbD venham a ser adotadas na indústria nacional.

## 6.1 INTRODUÇÃO

A indústria biofarmacêutica é única entre os diferentes ramos da biotecnologia em que, além de equipamentos, mão-de-obra e matérias-primas, uma fração considerável dos custos de produção resultam da necessidade de respeitar um marco regulatório exigente. Isso encarece cada etapa do ciclo de vida de medicamentos, incluindo desenvolvimento de produto e de processo, aprovação para comercialização, conformidade com Boas Práticas de Fabricação (GMPs, ou *Good Manufacturing Practices*) e acompanhamento pós-aprovação. A necessidade de uma regulamentação rigorosa é compreensível à luz de alguns dos casos históricos em que uma fiscalização insuficiente da indústria farmacêutica resultou em inestimável prejuízo à saúde.

Por outro lado, o complexo industrial farmacêutico é também responsável por ter melhorado a qualidade de vida de bilhões de pessoas ao redor do mundo e por ter aumentado a expectativa de vida de forma que seria inimaginável há algumas décadas. Infelizmente, o preço de uma regulamentação opressiva tem sido a considerável elevação do nível de investimento necessário para o desenvolvimento e produção de novos, e potencialmente revolucionários, tratamentos médicos. No momento de decidir a direção que novas pesquisas irão tomar, as empresas farmacêuticas são forçadas a pesar os crescentes custos de desenvolvimento de medicamentos contra o potencial de mercado. Isso tem causado a negligência de uma fração significativa de doenças, especialmente no caso de doenças órfãs (que afligem apenas uma pequena fração da população) e de doenças tropicais (que desproporcionalmente afetam pessoas e regiões financeiramente vulneráveis).

A fim de trazer todos os benefícios que a tecnologia moderna tem a oferecer aos pacientes cujo sofrimento, até agora, não tem recebido atenção suficiente, uma nova filosofia regulatória é necessária, que atenda tanto à necessidade de um alto padrão de qualidade quanto à redução dos seus custos decorrentes. Este será o tópico das próximas páginas.

## 6.2 CONTEXTO HISTÓRICO

As empresas farmacêuticas trouxeram a grande maioria dos medicamentos para o mercado, até o momento, dentro do paradigma tradicional de desenvolvimento de processos, ou Qualidade por Teste (QbT ou *Quality-by-Testing*). De acordo com esse paradigma, o fabricante inicialmente identifica um princípio ativo, projeta seu processo de produção e, caso o produto final atenda as especificações de qualidade, mantém os parâmetros do processo dentro de estreitos limites, que (com sorte) garantem a consistência do perfil de qualidade do medicamento. Apesar de seu sucesso histórico, essa abordagem tem limitado o potencial de melhoria de vários processos de produção estabelecidos e resultou em produtos vulneráveis a perturbações nos parâmetros de controle do processo, o que, em alguns casos, pode ter levado a recalls e desabastecimento de medicamentos.

No início dos anos 1990, a FDA (U.S. Federal Drug and Food Administration ou Agência Federal de Medicamentos e Alimentos dos EUA) alterou sua política de regular produtos individualmente e passou a supervisionar a indústria farmacêutica como um todo. Essa mudança incluiu a criação de vários novos requisitos para a indústria, o que resultou em um aumento substancial do tempo de revisão de alterações do Controle de Fabricação de Agentes Químicos (CMC na sigla original em inglês para *Chemical Manufacturing Control*). Como a aprovação de alterações no CMC é necessária antes que a implementação de inovações tecnológicas em processos de produção seja permitida, os fabricantes tornaram-se cautelosos ao investir no desenvolvimento de processos e, ao mesmo tempo, as agências reguladoras passaram a estar constantemente sobrecarregadas pelo crescente número de pedidos de mudança de processos a cada ano (Sangshetti *et al.*, 2017). Essa mudança de paradigma tem sufocado o desenvolvimento tecnológico de processos de manufatura, que tem permanecido ineficiente, embora os produtos farmacêuticos em si tenham sofrido uma notável evolução nas últimas décadas. O resultado do descompasso entre as tecnologias de produto e de processo tem sido um aumento exponencial dos custos de desenvolvimento de medicamentos e

a consequente estagnação da criação de novos produtos, que poderiam salvar vidas (Elliott *et al.*, 2013).

Para atender à necessidade de uma filosofia de desenvolvimento de processos farmacêuticos mais moderna, a FDA iniciou, em 2002, o programa de Boas Práticas Atuais de Fabricação de Produtos Farmacêuticos (CGMPs ou *Current Good Manufacturing Practices*) para o Século XXI: uma iniciativa de Abordagem Baseada em Risco (Pharmaceutical current good manufacturing practices (CGMPs) for the 21st Century: *A Risk-Based Approach initiative*) (FDA, 2004b), cujo principal objetivo é simplificar a revisão de mudanças em processos de fabricação, a fim de incentivar a indústria farmacêutica a introduzir inovação em tecnologia de processos e facilitar o alinhamento entre essas inovações e o marco regulatório existente. Entre outras proposições, este documento sugeriu a adoção de Quality-by-Design (QbD ou “Qualidade por Projeto”) e Tecnologia Analítica de Processos (PAT ou *Process Analytical Technology*) nos processos de fabricação de medicamentos (FDA, 2004b).

A filosofia QbD foi inicialmente popularizada por J. M. Juran e, desde o início dos anos 1990, encontrou ampla adoção na indústria automobilística. A QbD vê as necessidades do consumidor como a base do desenvolvimento de processos. Juran definiu qualidade como sendo a presença e a consistência dos atributos do produto que levam à satisfação do cliente. Ele, portanto, acreditava que a qualidade deveria ser projetada no processo de fabricação, em vez de simplesmente testada no produto final – ou seja, “Qualidade por Projeto” (Juran, 1992).

Posteriormente, a EMA (*European Medicines Agency* ou Agência Européia de Medicamentos) e a PMDA (*Pharmaceutical and Medical Devices Agency* ou Agência Farmacêutica e de Dispositivos Médicos do Japão) trabalharam juntas para alinhar suas respectivas estruturas regulatórias com a iniciativa das Boas Práticas de Fabricação Atuais do século XXI da FDA. As diretrizes Q8 a Q12 do Conselho Internacional sobre Harmonização de Requisitos Técnicos em Produtos Farmacêuticos para Uso Humano (ICH ou *International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use*) resumem estas recomendações unificadas.

A primeira recomendação oficial a descrever o desenvolvimento de processos farmacêuticos baseado em QbD foi a diretriz ICH Q8, publicada em 2004 e revisada em 2008 (Q8(R2)), que contém descrições e exemplos dos conceitos mais relevantes de QbD no desenvolvimento de formulações de medicamentos. A diretriz Q8(R2) alcançou a etapa 4 (step 4) em agosto de 2009 e é, portanto, oficialmente recomendada para adoção pelas agências reguladoras.

A próxima diretriz do ICH a ser publicada foi a Q9, que descreve os elementos necessários no Plano de Gerenciamento de Risco da Qualidade (*Quality Risk Management Plan*) e chegou à etapa 4 (step 4) em novembro de 2005. Posteriormente, em junho de 2008, a diretriz Q10 também alcançou a etapa 4 (step 4) e contém os requisitos para sistemas de qualidade farmacêuticos. Em maio de 2011, a Diretriz Q11 do ICH chegou à etapa 4 (step 4) e, assim, tornou-se a recomendação oficial para a implementação de QbD no desenvolvimento de substâncias farmacológicas ativas, incluindo produtos biológicos. Mais recentemente, a diretriz Q12 alcançou a etapa 4 (step 4) em novembro de 2019. A Diretriz ICH Q12 estende os aspectos necessários do Plano de Gerenciamento do Ciclo de Vida do Produto (*Product Lifecycle Management Plan*) inicialmente apresentados na diretriz Q10.

Em junho de 2018, o ICH publicou um comunicado listando as próximas diretrizes a serem esperadas. A diretriz ICH Q13 irá padronizar a terminologia utilizada em processos de produção contínuos, o que irá facilitar a redução de escalas de equipamentos e de tempos ociosos, bem como a aceleração de processamento (Silva e Seidel-Morgenstern, 2016; Kim *et al.*, 2017). Além disso, a diretriz ICH Q2 (Validação Analítica) será revisada e estendida na diretriz Q2(R2)/Q14, a fim de guiar a implementação de PAT. De acordo com o Plano de Trabalho publicado pelo ICH, a diretriz Q2(R2)/Q14 irá descrever as estratégias estatísticas necessárias para validar técnicas de análise multivariada, como espectroscopia de Raman, espectrometria de massas e espectroscopia de infravermelho próximo.

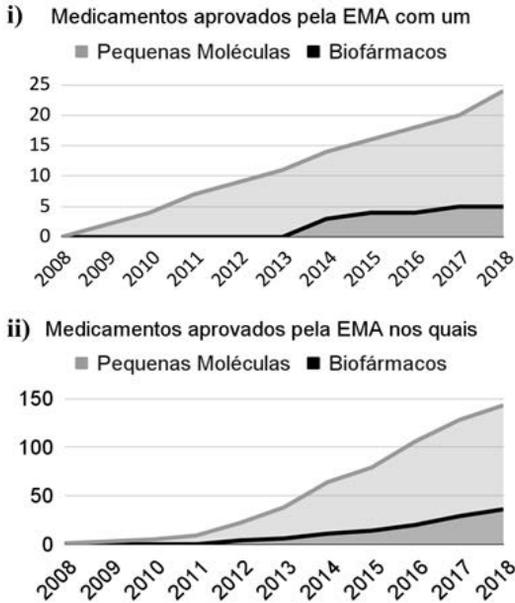
A adoção de QbD pelas companhias farmacêuticas está ganhando força, como demonstrado pelo exemplo do Januvia® (Sitagliptin,

Merck & Co, EUA), o primeiro medicamento a ser aprovado dentro do novo marco regulatório da FDA em 2006. Desde então, um total de 162 medicamentos que utilizaram elementos de QbD durante o desenvolvimento foram aprovados pela EMA (ver Figura III.1.ii). Dentre estes, apenas 24 reivindicaram um Espaço de Projeto (Design Space), ou seja, a possibilidade de alterar as condições de operação e as especificações do produto dentro de certos limites sem a necessidade de aprovação prévia das agências reguladoras (ver Figura III.1.i). A disparidade entre esses dois números pode tanto indicar uma dificuldade na obtenção da aprovação de Espaços de Projeto (Design Spaces) quanto uma falta de disposição por parte dos fabricantes em tentá-la. A tendência é, no entanto, encorajadora, dado que o número de medicamentos aprovados dentro do novo marco regulatório continua a crescer (Figura 6.1).

A primeira instância amplamente divulgada do desenvolvimento de um biofármaco baseado em QbD foi o do processo de fabricação de A-Mab, um anticorpo IgG1 humanizado usado no tratamento de linfoma não-Hodgkin indolente em adultos. Esse desenvolvimento foi realizado por uma iniciativa conjunta de algumas das principais empresas do ramo (Abbott, Amgen, Eli Lilly e Co., Genentech, GlaxoSmithKline, MedImmune e Pfizer), que colaboraram com as agências reguladoras para desenvolver um estudo de caso abrangente para servir como base para o desenvolvimento de processos de fabricação de biofármacos no futuro (CMC Biotech Working Group, 2009). Esse estudo de caso foi divulgado em 2009 e, em 2013, a indústria farmacêutica atingiu outro marco importante com a aprovação pela FDA do primeiro biofármaco a reivindicar um Espaço de Projeto (Design Space) dentro do paradigma QbD, Gazyvaro<sup>®</sup> (obinutuzumab, Roche AG, Suíça). Atualmente, existem mais três biofármacos aprovados pela EMA com um Espaço de Projeto (Design Space):

- Tecentriq<sup>®</sup> (atezolizumab, Roche AG, Suíça);
- Imrestor<sup>®</sup> (pegbovigrastim para uso veterinário, Eli Lilly & Co. Ltd., Reino Unido);
- Gardasil 9<sup>®</sup> (vacina contra HPV, Sanofi Pasteur SA, França).

**Figura 6.1.** i) Número total de medicamentos aprovados pela EMA onde um Espaço de Projeto (Design Space), ou seja, operação flexibilizada, foi aprovado. ii) Número total de medicamentos aprovados pela EMA nos quais elementos de QbD foram usados durante o desenvolvimento (organizados por ano). \* Em julho de 2021. \*\* Excluindo medicamentos que não estejam mais autorizados.



## 6.3 DESENVOLVIMENTO BASEADO EM QbD

Como mostrado na Figura 6.2, no paradigma tradicional de desenvolvimento de medicamentos (“Qualidade por Teste” ou *Quality-by-Testing*), o desenvolvimento do processo geralmente começa com a definição do princípio ativo, seguido por iterações de ajuste do processo de fabricação até que o produto final atenda a todas as especificações de segurança e eficácia (Figura 6.2.ii). Por outro lado, como mostrado na Figura 6.2.i, dentro do paradigma QbD, o ponto de partida para o

desenvolvimento são as expectativas dos clientes, que formam o Perfil Alvo de Qualidade do Produto (ou QTPP ou *Quality Target Product Profile*). A diferença é que o QTPP define uma aplicação específica, bem como o perfil de segurança e eficácia desejados para o produto e não apenas seu princípio ativo. Ou seja, o espírito do desenvolvimento baseado em QbD é “começar com o final em mente”.

O QTPP pode, no entanto, ser difícil de se avaliar ao longo do desenvolvimento do processo, portanto, dentro da estrutura do QbD, ele deve ser traduzido para parâmetros substitutos mensuráveis, os Atributos Críticos de Qualidade (CQA ou *Critical Quality Attributes*) que servem como base para o desenvolvimento do processo e para o gerenciamento de riscos.

Conforme será descrito em mais detalhes adiante, de acordo com QbD, o fabricante deve tipicamente delinear o QTPP com base na prática experimental com o produto. Esse esforço pode, no entanto, ser significativamente simplificado, caso já exista literatura científica descrevendo sua farmacocinética, farmacodinâmica, possíveis efeitos colaterais e os principais problemas do produto. Consequentemente, a aplicação dos princípios de QbD no desenvolvimento de medicamentos biossimilares e biobetters é muito propícia (Brumano *et al.*, 2019).

Dentro do paradigma tradicional QbT, uma vez que o produto farmacêutico final atenda a todas as especificações, a agência reguladora o aprova e o fabricante restringe a alteração dos parâmetros operacionais do processo de produção para garantir a consistência do produto. Essa abordagem tem, no entanto, a desvantagem de desmotivar as empresas a investir na melhoria de processos, uma vez que as agências reguladoras só podem aprovar mudanças no processo após uma demonstração completa de que as alterações propostas não afetarão as características finais do produto. De acordo com a FDA (FDA, 2004b), essa demanda tem levado os fabricantes a não investigar adequadamente os mecanismos que correlacionam variáveis de processo e o perfil de qualidade do produto. Isso tem resultado em uma compreensão incompleta das causas de variabilidade de produtos farmacêuticos. Consequentemente, com o paradigma QbD, as agências reguladoras procuram facilitar a



desperdício e variabilidade de produtos, os quais também são desejáveis do ponto de vista da saúde pública e da preservação do meio ambiente (Elliott *et al.*, 2013). Por outro lado, na abordagem tradicional de QbT, apenas os dados referentes à versão final do processo de fabricação fazem parte do registro.

Por fim, outro aspecto central no desenvolvimento de processos de acordo com a filosofia QbD é o requerimento de uma política de gerenciamento de riscos com a qual o fabricante possa avaliar e mitigar os efeitos que perturbações no processo exercem no perfil de qualidade do produto final. Com a adição desta recomendação, as agências reguladoras esperam reduzir casos de desabastecimento causados por perda de lotes, os quais podem prejudicar o público tanto financeiramente quanto em termos de saúde. Dessa forma, além da óbvia vantagem econômica de perder menos produto, os fabricantes também irão lucrar com um processo mais rápido de liberação de lotes.

Seguindo a tendência internacional, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) publicou, em 22 de agosto de 2019, a Resolução da Diretoria Colegiada nº 301 (republicada pela última vez no DOU nº 78, de 24 de abril de 2020) que dispõe sobre as Diretrizes Gerais de BPF (RDC 301/19, 2019). Esta RDC reforça a importância do Gerenciamento de Risco como parte da Gestão da Qualidade Farmacêutica, aproximando, assim, o marco regulatório nacional ao da ICH com o objetivo de aumentar a competitividade da indústria farmacêutica brasileira no mercado internacional.

O objetivo de longo prazo das agências reguladoras é permitir a liberação em tempo real de produtos farmacêuticos (*real-time release*), o que significa a liberação de lotes com base apenas em dados de processo, em oposição à abordagem tradicional de QbT que envolve testar extensivamente o produto acabado antes de permitir sua liberação. A fim de alcançar este objetivo, as agências reguladoras recomendam o desenvolvimento e implementação de Tecnologia Analítica de Processos (PAT ou *Process Analytical Technology*) nas linhas de produção (FDA, 2004a). PAT refere-se à ferramentas analíticas não destrutivas que permitem a medição online de variáveis de processo normalmente

difíceis de avaliar, como por exemplo níveis de expressão gênica, concentração de metabólitos secundários, entre outras, que podem ajudar a prever resultados de processos e controlar a variabilidade de produtos (FDA, 2004a).

## 6.4 ESPAÇO DE PROJETO DO PRODUTO (*PRODUCT DESIGN SPACE*)

Como mostrado na Figura 6.2, a primeira etapa do desenvolvimento do processo dentro do paradigma QbD é a definição do Perfil Alvo de Qualidade do Produto (QTPP ou *Quality Target Product Profile*) do potencial medicamento, o qual deve incluir, por exemplo, sua indicação, via de administração, forma de dosagem, características farmacocinéticas, estabilidade, pureza e esterilidade. Como mencionado anteriormente, no caso de medicamentos biossimilares e biobetters, a definição do QTPP pode ser baseada em dados da literatura científica e em conhecimento preexistente sobre o produto originador ou inovador. Como exemplo, a Eli Lilly & Co. Ltd. (Reino Unido) definiu o QTPP de Imrestor<sup>®</sup> (pegbovigrastim, uma versão peguilada do fator bovino estimulante de colônias de granulócitos) em termos de sua estabilidade, farmacodinâmica, farmacocinética, toxicologia, imunogenicidade, segurança para o usuário (humano) e tolerância no animal alvo (bovino).

Após a definição do QTPP, os Atributos Críticos de Qualidade (CQA ou Critical Quality Attributes) são selecionados dentre as características quantificáveis do produto final e normalmente incluem propriedades físicas, químicas, bioquímicas e microbiológicas. Os CQAs formam o Perfil Analítico Alvo (*Analytical Target Profile*) do potencial medicamento. A primeira etapa do processo de seleção dos CQAs é a identificação de potenciais conexões entre os atributos do produto e seu perfil de qualidade, usando ferramentas como diagramas de Ishikawa (espinha de peixe) e correlações estatísticas. Esses atributos são então ranqueados utilizando Métodos de Classificação e Filtragem de Risco (RRF ou *Risk Rank and Filtering*), como, por exemplo, a Análise dos Modos de Falha e seus Efeitos (FMEA ou Failure Mode and Effects Analysis), que partem de sistemas pré-definidos de pontuação para estimar aproximadamente

a criticidade de atributos com base na incerteza e no impacto que não conformidades podem ter no perfil de qualidade.

Os dossiês de A-Mab e Gazyvaro® (Roche AG, Suíça) fornecem exemplos interessantes de como implementar FMEA no processo de seleção de CQAs (CMC Biotech Working Group, 2009). Em ambos os casos, mais de um sistema de pontuação foram utilizados em paralelo para definir a criticidade:

1. *Conhecimento Prévio*. Os produtos em estudo foram anticorpos monoclonais e, como resultado da literatura científica preexistente nesta área, as especificações de produtos semelhantes já no mercado foram automaticamente consideradas Atributos Críticos de Qualidade.

2. *Criticidade = Impacto × Incerteza*. As pontuações de Impacto dos Atributos de Qualidade foram definidas com base no efeito que eles têm nos seguintes aspectos do QTPP: atividade biológica, farmacocinética, imunogenicidade e segurança. As pontuações de Incerteza foram definidas com base no nível de conhecimento disponível a respeito do efeito que a variação em cada um dos atributos exercem nos quatro aspectos do QTPP mencionados anteriormente. O resultado deste sistema foi a criação de quatro listas paralelas de CQAs.

3. *Criticidade = Severidade × Probabilidade*. As pontuações de Severidade foram definidas da mesma forma que Impacto no sistema anterior. A Probabilidade, no entanto, foi definida como a possibilidade de cada atributo sair das especificações, o que resultou em uma estrutura diferente para avaliar a Criticidade e, conseqüentemente, em uma lista diferente de CQAs.

Os atributos considerados críticos em cada uma dessas categorias foram reunidos para que a seleção final de CQAs fosse a mais abrangente possível. Os autores consideraram que esta estratégia seja suficientemente conservadora para compensar a novidade da abordagem QbD.

Os CQAs determinados com base nessa metodologia para o Gazyvaro® (Roche AG, Suíça) foram divididos em sete categorias:

- Presença de variantes: relacionadas ao tamanho, carga, oxidação, glicosilação ou à estrutura.
- Contaminação com impurezas provindas do processo: proteína da célula hospedeira (HCP ou Host Cell Protein), DNA e proteína A.
- Contaminação com matérias-primas: componentes das soluções de cultura e de purificação (nutrientes, elementos-traço, sais, tampões, dentre outros).
- Contaminação por componentes extraíveis: filtros, materiais de embalagens, etc.
- Contaminação com agentes adventícios: vírus, bactérias e endotoxinas.
- Composição e força do medicamento e do princípio ativo: conteúdo proteico, osmolalidade, pH, aparência (cor, opalescência, claridade), conteúdo de L-histidina, teor de trealose e poloxamero 188.
- Características da formulação: partículas visíveis e sub-visíveis, volume extraível e esterilidade.

Usando uma estratégia semelhante à empregada pela Roche AG (Suíça), a Eli Lilly & Co. Ltd. (Reino Unido) considerou os CQAs de Imrestor® (pegbovigrastrim) como sendo o nível de agregação de proteínas, oxidação, carbamilação, alteração em pontes dissulfeto, formação de acetil-hidrazida, contaminação residual com solventes e atividade biológica.

Outra abordagem interessante para a seleção dos CQAs foi proposta por Zhang e Mao em 2017.

*Criticidade = Severidade × Probabilidade de Ocorrência × Possibilidade de Detecção*

A incompatibilidade mútua entre estas estratégias demonstra que não necessariamente existe uma maneira única ou correta para classificar os atributos de qualidade, o que ressalta a importância de uma reflexão profunda a respeito da melhor estratégia em cada situação.

Dentro do paradigma QbD, também é essencial desenvolver uma compreensão dos mecanismos por trás das correlações encontradas, a fim de melhor fundamentar a atribuição de criticidade aos atributos de qualidade do produto. Além disso, no caso de produtos biossimilares, é importante que os CQAs escolhidos correspondam, na medida do possível, aos do medicamento originador ou inovador.

Seguindo a definição dos CQAs, as metodologias analíticas para a avaliação destes atributos devem ser estabelecidas com atenção especial à precisão, à seletividade, à sensibilidade e à robustez. As monografias listadas nas farmacopeias são uma boa fonte (embora frequentemente limitadas) de informações para isso.

O próximo passo é a delimitação das faixas aceitáveis para os CQAs, que, dentro da filosofia QbD, são definidas como o Espaço de Projeto do Produto (*Product Design Space*) de forma multidimensional. Esta abordagem é diferente do paradigma tradicional QbT, que utiliza especificações unidimensionais. Como será explorado em mais detalhe na próxima seção, espaços multidimensionais (tanto para especificações do produto quanto do processo) resultam em uma operação mais flexível, já que as agências reguladoras permitem alterações de especificação dentro do Espaço de Projeto (*Design Space*) aprovado sem a necessidade de aprovação do Controle de Fabricação de Agentes Químicos (CMC ou *Chemical Manufacturing Control*) na FDA, ou um pedido de alteração do tipo II (*type II variation application*) à EMA, que atualmente custa € 89.000.

Um dos princípios da filosofia QbD é que “o produto é o processo”. Dessa forma, somente após o estabelecimento do QTPP e dos CQAs o desenvolvimento do processo de fabricação em si pode começar. O primeiro passo é apresentar o conceito inicial do processo de produção, que pode ser baseado em plataformas preexistentes ou concebido do zero. Seja qual for o caso, o passo seguinte é a identificação dos Parâmetros Críticos do Processo (CPP ou *Critical Process Parameters*) e dos Atributos Materiais Críticos (CMA, ou *Critical Material Attributes*).

Parâmetros Críticos do Processo (CPPs) incluem as variáveis físico-químicas das operações unitárias, como pH, temperatura,

concentrações de nutrientes e condutividade, que podem ser mantidas dentro de faixas pré-definidas por controles automatizados. Os Atributos Materiais Críticos (CMAs), por outro lado, vão desde solventes, matérias primas, excipientes, materiais de embalagem, tampões, meios de cultura, soluções de estoque até resinas cromatográficas e membranas de filtro.

Conforme mostrado na Figura 6.2.i, antes que a avaliação da criticidade possa ser iniciada, os métodos analíticos necessários precisam ser estabelecidos. Estes incluem sensores para os parâmetros físico-químicos das operações unitárias, os quais pertencem à Tecnologia Analítica de Processos (PAT ou Process Analytical Technology) (FDA, 2004a), bem como técnicas analíticas laboratoriais para avaliar os aspectos de qualidade das matérias-primas<sup>1</sup>. Posteriormente, a criticidade dos parâmetros do processo e de atributos materiais começa com Métodos de Classificação e Filtragem de Risco (RRF ou Risk Rank and Filtering), seguida por análises de sensibilidade e termina com a proposição de modelos matemáticos que os correlacionam aos CQAs.

A diretriz Q9 do ICH sugere alguns métodos de RRF para o desenvolvimento de processos de acordo com a filosofia QbD, incluindo FMEA, Análise de Árvore de Falhas (FTA ou *Fault Tree Analysis*), Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (HACCP ou *Hazard Analysis and Critical Control Points*) e Análise de Operacionalidade de Perigo (HAZOP ou *Hazard Operability Analysis*) e outras ferramentas estatísticas. Teoricamente, a avaliação de risco deveria começar com as operações unitárias com o maior potencial de afetar negativamente o QTPP e, em seguida, proceder para as que têm menor impacto. Na prática, no entanto, é mais fácil primeiro focar nas operações finais de downstream, já que estas são as mais próximas ao paciente e, somente depois, progredir para as operações de upstream, uma vez que pequenas perturbações nas etapas iniciais do processo podem ser corrigidas pelo processamento posterior (Elliott *et al.*, 2013).

Após a avaliação de risco inicial, os efeitos combinados da alteração dos parâmetros do processo e das matérias-primas são avaliados usando técnicas de planejamento experimental (DoE do inglês *Design of*

---

<sup>1</sup> Tal como a presença de substâncias contaminantes, material particulado ou microrganismos.

*Experiments*), como, por exemplo, Plackett-Burman e Taguchi. Estes estudos têm o objetivo duplo de atribuir criticidade aos parâmetros do processo e de gerar modelos matemáticos iniciais do processo de produção.

Ao delinear esses experimentos, é importante considerar intervalos amplos para cada parâmetro, mesmo se a operação normal for perfeitamente capaz de manter o processo operando dentro de margens estreitas. Esse cuidado é necessário para evitar negligenciar atributos de qualidade que sejam de fato críticos quando fora da especificação, mas que não aparentam ser em situações normais de operação. Idealmente, a região caracterizada do Espaço de Projeto do Processo (*Process Design Space*) deve ser muito maior do que sua região normal de operação, a fim de evitar que a operação do processo esteja próxima de território inexplorado (Elliott *et al.*, 2013).

Os modelos matemáticos obtidos utilizando a metodologia DoE normalmente são funções empíricas representando superfícies de resposta, que permitem inferir a sensibilidade dos CQAs à variação de parâmetros do processo (ou seja, análise de sensibilidade) e também permitem sugerir possíveis relações causais. Modelos empíricos não devem, via de regra, ser extrapolados para condições não testadas, bem como para diferentes escalas. Portanto, é vantajoso para o fabricante desenvolver modelos mecanicistas mais sofisticados que expliquem as conexões entre os parâmetros do processo e os CQAs.

De posse de um modelo computacional adequado do processo de fabricação, é possível fornecer informações para o controle baseado em risco (*risk-based control*) usando análises de incerteza *in silico*. A análise de incerteza permite a estimativa da expectativa de que os valores dos CQAs vão sair dos intervalos especificados durante a operação do processo e pode servir de base para estimativas *in silico* dos Índices de Capacidade do Processo ( $Cpk^2$ ).

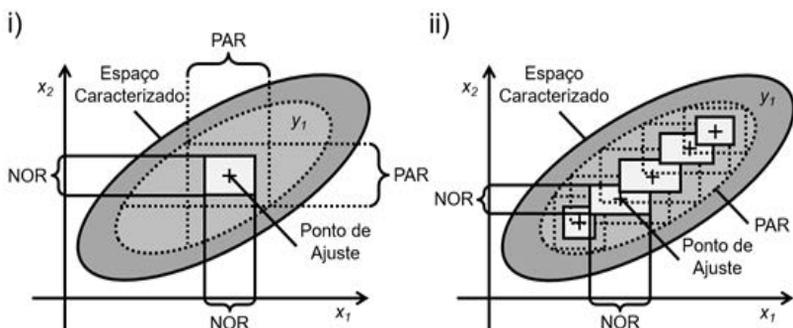
---

<sup>2</sup>  $Cpk$  é a razão entre a faixa comprovadamente aceitável de um determinado CQA e a largura de seis vezes seu desvio padrão sendo, portanto, um medidor do nível de controle do processo. Tradicionalmente, na indústria biofarmacêutica,  $Cpks$  maiores do que 1 são normalmente entendidos pelas agências reguladoras como resultantes de um nível suficiente de controle do processo. A variabilidade do produto é, no entanto, normalmente avaliada com base em três lotes bem-sucedidos consecutivos, o que, na prática, pode resultar em especificações desnecessariamente restritivas.

Uma vez que todas as fontes de variabilidade dos CQAs originadas na operação do processo tenham sido identificadas, seu efeito na qualidade do produto final tenha sido estimado e modelos matemáticos que expliquem as relações causais subjacentes tenham sido validados, o próximo passo é a definição do Espaço de Projeto do Processo (*Process Design Space*) em si. O Espaço de Projeto do Processo é definido em termos dos parâmetros operacionais do processo (ou seja, os CPPs) bem como CMAs e é expresso como um objeto multidimensional, para levar em consideração os efeitos que as interações entre os diferentes parâmetros podem ter nos CQAs. Essa abordagem contrasta com a forma tradicionalmente unidimensional na qual as agências reguladoras historicamente exigiam a definição de faixas aceitáveis para variáveis do processo e para atributos materiais o que, como demonstrado na Figura 6.3, em última análise resulta na flexibilização da operação do processo.

Neste exemplo consideram-se, para maior clareza, apenas duas variáveis contínuas de controle ( $x_1$  e  $x_2$ ). No entanto, as mesmas conclusões permanecem verdadeiras quando se considera um número maior de variáveis. Como mostrado na figura à esquerda, se apenas Amplitudes Normais de Operação (NOR ou *Normal Operating Ranges*) e Amplitudes Comprovadamente Aceitáveis (PAR ou *Proven Acceptable Ranges*) unidimensionais forem consideradas, a região operacional do processo fica restrita a um retângulo inscrito no Espaço de Projeto do Processo (*Process Design Space*) centralizado no ponto de ajuste, deixando de fora todas as outras combinações de valores de parâmetros possíveis mostradas na figura à direita. Desta forma, QbD permite a flexibilização da operação do processo ao definir o Espaço de Projeto do Processo como um objeto multidimensional (Stockdale e Cheng, 2009).

**Figura 6.3.** Comparação entre as regiões de operação resultantes de especificações unidimensionais de parâmetros do processo (i) e de especificações multidimensionais que definem um Espaço de Projeto do Processo (*Process Design Space*) (ii). Fonte: Stockdale e Cheng, 2009.



Uma vez que a agência reguladora tenha aprovado o Espaço de Projeto do Processo (*Process Design Space*), a operação dentro de seus limites não é mais considerada uma mudança e, portanto, não requer revalidação. Por enquanto, esta flexibilização de operação ainda não está prevista pela ANVISA, como demonstrado no artigo nº 177 da RDC 301/19, o qual requer a revalidação de processo após qualquer alteração que possa afetar a qualidade do produto final ou a reprodutibilidade do processo (RDC 301/19, 2019). Ou seja, a legislação nacional ainda não prevê o conceito de Espaço de Projeto do Processo, embora esteja movendo-se na direção de alinhar-se com as diretrizes internacionais, uma vez que a ANVISA é um dos membros regulatórios do ICH.

O Espaço de Projeto do Processo inclui não apenas parâmetros físico-químicos, mas também o perfil de evolução de variáveis dependentes do tempo no caso de operações como cultivo em batelada, separação cromatográfica, liofilização, precipitação, etc. Além disso, o Espaço de Projeto do Processo pode ser definido individualmente, para cada operação unitária, ou abrangendo o processo de fabricação como um todo, o que facilita ainda mais a implementação de mudanças pós-aprovação que não influenciam o perfil de qualidade do produto.

O ICH também recomenda que o Espaço de Projeto do Processo seja definido em termos de variáveis independentes da escala, como por exemplo número de aeração, número de Reynolds, número de potência, tempo de mistura, tempo de remoção de CO<sub>2</sub> (*CO<sub>2</sub>-stripping time*), KLa e volume de retenção de gás (*gas hold-up volume*). Neste caso, a vantagem para os fabricantes é que alterações de escala dentro do intervalo validado do modelo do processo poderão ser executadas sem a necessidade de nova aprovação (CMC Biotech Working Group, 2009).

O conceito de Espaço de Projeto do Processo está oficialmente reconhecido pelas agências reguladoras internacionais desde a publicação da diretriz Q8(R2) em 2008 pelo ICH. Embora a primeira aprovação de um Espaço de Projeto do Processo para um medicamento de molécula pequena (saxagliptin, Bristol-Myers Squibb/AstraZeneca) já tenha ocorrido em 2009, foram necessários mais 5 anos para que o Espaço de Projeto do Processo tenha sido aprovado para um biofármaco (albiglutide, GSK) pela EMA, em 2014. O principal motivo para este atraso tem sido a dificuldade em justificar o Espaço de Projeto de processos biofarmacêuticos em pedidos de autorização de comercialização. Esse problema foi abordado pela primeira vez por J. Peterson em 2008, que propôs a aplicação da inferência Bayesiana seguida de Simulações Preditivas Posteriores para identificar as condições operacionais do processo que geram produtos dentro das especificações com confiabilidade suficiente para serem incluídos no Espaço de Projeto do Processo (Peterson, 2008).

Simulações Preditivas Posteriores (SPPs) são uma forma de modelagem por ensemble usada para estimar a distribuição dos resultados esperados do processo dada a incerteza nos parâmetros do modelo, a qual é, por sua vez, estimada por meio de inferência Bayesiana. O poder desta abordagem tem sido amplamente reconhecido pelo FDA, EMA e ICH, bem como pelas principais multinacionais biofarmacêuticas, que a utilizaram para descrever o Espaço de Projeto do Processo de produção do A-Mab (CMC Biotech Working Group, 2009). Desde então, a maioria dos Espaços de Projeto de Processos biofarmacêuticos aprovados pela EMA foram mapeados utilizando variações desse método.

## 6.5 ESTRATÉGIA DE CONTROLE

A próxima etapa no ciclo QbD de desenvolvimento de processos (Figura 6.2.i) é a proposição de uma estratégia de controle baseada em risco (risk-based) para o processo de produção. Isto está de acordo com os princípios de QbD mencionados acima, uma vez que a meta é conceder mais autonomia às empresas na condição de que seja demonstrado um entendimento científico profundo do processo de produção. Uma estratégia de controle baseada em risco deve ter como fundamento o conhecimento dos riscos do processo de produção além de modelos matemáticos confiáveis.

De acordo com a ANVISA, o foco da Política de Gerenciamento de Risco é a segurança do paciente e deve incluir uma Estratégia de Mitigação de Risco cobrindo o Plano de Tomada de Decisão, principalmente no que diz respeito ao recalls, como evitar desabastecimento e o plano de notificação da ANVISA (RDC 301/19, 2019). Além disso, o artigo nº 172 da RDC 301/19 exige um processo de Gerenciamento de Risco da Qualidade com foco na avaliação toxicológica e de potência dos medicamentos produzidos por uma mesma fábrica de forma a reduzir os riscos de contaminação cruzada entre os processos produtivos.

Um dos aspectos fundamentais de uma estratégia de controle baseada em risco é o emprego de Tecnologia Analítica de Processos (PAT ou *Process Analytical Technology*). PAT refere-se especificamente a técnicas avançadas de monitoramento de processos, que permitem a medição e o controle de variáveis normalmente difíceis de medir. Devido ao fato de as agências reguladoras enfatizarem a importância da confiabilidade de metodologias analíticas, existe um interesse crescente no desenvolvimento de tecnologias sofisticadas, como HPLC, espectroscopia de dicroísmo circular, espectroscopia de infravermelho próximo (NIR), espectrometria de massas (MS), eletroforese capilar, espectroscopia Raman e uma miríade de técnicas hífenadas como HPLC-MS. Para que essas técnicas possam ajudar a melhor compreender as operações unitárias de bioprocessos, a diretriz Q2(R2)/Q14 do ICH irá descrever os métodos estatísticos necessários para validá-las.

A PAT permitirá uma melhor medição e controle de variáveis do produto (como peso molecular, sequência de aminoácidos, oxidação de resíduos de metionina, desnaturação e agregação) e de variáveis relacionadas ao processo (como a concentração de metabólitos secundários, níveis de expressão gênica, etc.), o que poderá vir a resultar em melhores sistemas de garantia de qualidade. Uma perspectiva interessante é a utilização desses dados como base de modelos computacionais mais sofisticados do processo de produção que serão utilizados no controle de processos baseado em *Digital Twins* como parte do processo de digitalização do setor farmacêutico (Pharma 4.0).

De modo geral, uma estratégia de controle baseada em risco deve incluir o controle dos atributos das matérias-primas (como as citadas na seção anterior), das especificações do produto e das operações unitárias. Tal estratégia deve também conter um programa de monitoramento que vise a contínua validação e extensão dos modelos matemáticos do processo utilizando PAT.

O objetivo de longo prazo das agências reguladoras é permitir a Liberação em Tempo Real (*Real-Time Release*) de produtos farmacêuticos, ou seja, o controle em tempo real dos CQAs com base em dados do processo. Com o desenvolvimento de controles proativos (*feed-forward*), as agências reguladoras buscam reduzir tempos de espera pós-processamento e simplificar a liberação do produto final. Com este novo paradigma espera-se uma redução do número de recalls e de perdas de lotes, bem como a extensão dos prazos de validade efetivos (tempo de prateleira) dos medicamentos. As agências reguladoras esperam, dessa forma, minimizar casos de desabastecimento de medicamentos e garantir o fornecimento de produtos de maior qualidade ao público.

## 6.6 PLANO DE GERENCIAMENTO DO CICLO DE VIA (*LIFECYCLE MANAGEMENT PLAN*)

Como mostrado na Figura 6.2.i, a filosofia QbD implica na melhoria contínua tanto do medicamento quanto de seu processo de fabricação

com base no acúmulo de conhecimentos relativos ao desempenho do processo de produção, à eficácia da estratégia de controle e à experiência clínica pós-aprovação. De acordo com as diretrizes Q10, Q11 e Q12 do ICH, assim como a RDC nº 301 de 2019 da ANVISA, uma estratégia prévia deve ser estabelecida para a forma como novos conhecimentos sobre o processo devem ser coletados e aplicados na melhoria contínua. O assim chamado Plano de Gerenciamento do Ciclo de Vida (*Lifecycle Management Plan*) deve fazer parte da documentação do processo de fabricação e incluir as responsabilidades gerenciais (o que é frisado na RDC nº301/19) e os sistemas de qualidade que o fabricante irá implementar para gerenciar o conhecimento sobre o medicamento e sobre o processo de produção em todas as fases do ciclo de vida do produto. As fases do ciclo de vida do produto listadas na diretriz Q10 do ICH incluem: desenvolvimento farmacêutico, transferência de tecnologia para outros locais de fabricação ou empresas, produção comercial, melhoria do processo e descontinuação do produto.

É importante, neste ponto, frisar a diferença entre conhecimento e dados. Embora a coleta contínua de dados de processo e de produto seja fundamental para a expansão do conhecimento de processo, não é suficiente para garanti-la. Conhecimento são dados que permitem a tomada de decisões. Portanto, um sistema de gestão de conhecimento deve incluir não apenas o modelo de aquisição de dados, mas também para sua análise, armazenamento e disseminação.

Uma das maneiras pelas quais novos dados de processo podem ser incorporados ao conhecimento de processo é o contínuo refinamento e revalidação de modelos computacionais, seja na forma do recálculo dos valores médios de parâmetros ou na reavaliação de suas significâncias estatísticas (Elliott *et al.*, 2013) ambos os quais podem ser realizados utilizando inferência Bayesiana (Peterson, 2008). Além disso, conjuntos maiores de dados (tanto na forma de maiores números de amostras quanto de dados físico-químicos mais diversificados) podem ser usados para propor novos modelos de mecanismos para as operações unitárias.

No paradigma QbD, as especificações do produto podem ser movidas dentro do Espaço de Projeto (Design Space) aprovado, sem

a necessidade de nova avaliação pelas agências reguladoras. Portanto, a maneira pela qual essas mudanças podem vir a ser implementadas e como deverão ser documentadas também deve fazer parte do Plano de Gerenciamento do Ciclo de Vida. Para justificar e, ainda mais importantemente, motivar essas mudanças, os dados referentes à resposta do consumidor ao medicamento devem ser coletados.

No contexto da indústria farmacêutica, os consumidores não são apenas os pacientes, mas também os médicos, profissionais de saúde, seguradoras e agências reguladoras e, portanto, a tomada de decisões após a aprovação pode vir a ser motivada pela reação do mercado em qualquer uma destas esferas. Em se tratando de pacientes, por exemplo, a resposta da população ao tratamento, incluindo reações adversas e interações imprevistas com outros medicamentos, pode vir a motivar a necessidade de alterar as especificações da formulação ou da substância farmacológica ativa. Na maioria das vezes, no entanto, as decisões sobre o tratamento não são tomadas pelos pacientes, mas pelas equipes médicas responsáveis. Portanto, é essencial manter um canal de comunicação aberto com a comunidade médica, a fim de coletar informações sobre preocupações com relação aos riscos, as imitações e aos custo-benefício de tratamentos que podem vir a justificar alterações de especificações após a aprovação dentro do Espaço de Projeto (*Design Space*) do produto. Por fim, a cobertura de tratamentos médicos é definida pelas companhias seguradoras que, dependendo do país, podem ser públicas, privadas ou, como é mais comum, uma mistura dos dois. Dessa forma, o custo-benefício e a opinião pública sobre tratamentos médicos podem desempenhar um papel importante na definição da cobertura de planos de saúde, o que, por sua vez, impacta a comercialização de medicamentos e pode, portanto, vir a motivar mudanças na especificação de produtos após a autorização de comercialização.

## 6.7 CONCLUSÕES

Neste capítulo, foram explorados diferentes conceitos de QbD farmacêutico, assim como os benefícios da utilização desta filosofia para guiar o desenvolvimento de processos de produção farmacêuticos. No

entanto, é importante lembrar que cada processo é único, de forma que nem sempre será possível desenvolver processos de produção seguindo exatamente as etapas descritas nas seções anteriores, sendo necessário ajustar a aplicação das ferramentas de QbD para cada caso. Por fim, é necessário frisar a importância de se ajustar a estratégia de desenvolvimento de processos ao contexto regulatório local para que a promessa das vantagens de flexibilização, assim como da redução de perdas de lotes e dos custos de conformidade regulatória possam vir a ser concretizadas.

## LEITURA COMPLEMENTAR



O leitor interessado no aprofundamento dos tópicos aqui abordados poderão encontrar conteúdos nas bibliografias abaixo listadas.

ICH. Quality Risk Management Q9. In **International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use**. [https://www.ich.org/fileadmin/Public\\_Web\\_Site/ICH\\_Products/Guidelines/Quality/Q9/Step4/Q9\\_Guideline.pdf](https://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q9/Step4/Q9_Guideline.pdf), 2005.

ICH. Pharmaceutical Quality System Q10. In **International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use**. [https://www.ich.org/fileadmin/Public\\_Web\\_Site/ICH\\_Products/Guidelines/Quality/Q10/Concept\\_papers/Q10\\_Concept\\_Paper.pdf](https://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q10/Concept_papers/Q10_Concept_Paper.pdf), 2008.

ICH. Pharmaceutical Development Q8(R2). In **International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use**. [https://www.ich.org/fileadmin/Public\\_Web\\_Site/ICH\\_Products/Guidelines/Quality/Q8\\_R1/Step4/Q8\\_R2\\_Guideline.pdf](https://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q8_R1/Step4/Q8_R2_Guideline.pdf), 2009.

ICH. Development and Manufacture of Drug Substances (Chemical Entities and Biotechnological/Biological Entities) Q11. **In International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use.** [https://www.ich.org/fileadmin/Public\\_Web\\_Site/ICH\\_Products/Guidelines/Quality/Q11/Q11\\_Step\\_4.pdf](https://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q11/Q11_Step_4.pdf), 2012.

ICH. Technical and Regulatory Considerations for Pharmaceutical Product Lifecycle Management Q12. **In International Council on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use**, 1–31. [https://database.ich.org/sites/default/files/Q12\\_Guideline\\_Step4\\_2019\\_1119.pdf](https://database.ich.org/sites/default/files/Q12_Guideline_Step4_2019_1119.pdf), 2019.

## AGRADECIMENTOS

O autor reconhece o suporte acadêmico e profissional fornecido pelo Laboratório de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, assim como suporte financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, processo número 2018/03734-9), sem os quais a publicação deste capítulo não seria possível.

## REFERÊNCIAS

- Brumano, L.P., Silva, F.V.S., Costa-Silva, T.A., Apolinário, A.C., Santos, J.H.P.M., Kleingesinds, E.K., Monteiro, G., Rangel-Yagui, C.O., Benyahia, B., Junior, A.P. Development of L-Asparaginase biobetters: Current research status and review of the desirable quality profiles. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 6: 212. 2019.
- CMC Biotech Working Group. A-Mab: A Case Study in Bioprocess Development (p. 1–278). EMA. 2009. [https://cdn.ymaws.com/www.casss.org/resource/resmgr/imported/A-Mab\\_Case\\_Study\\_Version\\_2-1.pdf](https://cdn.ymaws.com/www.casss.org/resource/resmgr/imported/A-Mab_Case_Study_Version_2-1.pdf)
- Silva, F.V.S., Seidel-Morgenstern, A. Evaluation of center-cut separations applying simulated moving bed chromatography with 8 zones. *Journal of Chromatography A*. 1456: 123–136. 2016.
- Elliott, P., Billingham, S., Bi, J., Zhang, H. Quality by design for biopharmaceuticals: A historical review and guide for implementation. *Pharmaceutical Processing*. 1: 105–122. 2013.
- FDA. Guidance for Industry PAT — A Framework for Innovative Pharmaceutical Development, Manufacturing, and Quality Assurance. 2004a. <https://www.fda.gov/downloads/drugs/guidances/ucm070305.pdf>
- FDA. Pharmaceutical cGMPS for the 21st century—A Risk-Based Approach. U.S Food and Drug Administration (FDA). 2004b.
- Juran, J.M. *Juran on Quality by Design: The New Steps for Planning Quality into Goods and Services (Second)*. Free Press. 1992.
- Kim, K.-M., Lee, J.W., Kim, S., Silva, F.V.S., Seidel-Morgenstern, A., Lee, C.-H. Advanced operating strategies to extend the applications of simulated moving bed chromatography. *Chemical Engineering & Technology*. 40: 2163–2178, 2017.

Peterson, J.J. A Bayesian approach to the ICH Q8 definition of design space. *Journal of Biopharmaceutical Statistics*. 18: 959–975. 2008.

Resolução da Diretoria Colegiada—RDC No 301, de 21 de agosto de 2019 (\*), no. 301, Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA (2019). [http://antigo.anvisa.gov.br/documents/10181/5389382/%286%29RDC\\_301\\_2019\\_COMP.pdf/7d991c04-e7a1-4957-aed5-3689c62913b2](http://antigo.anvisa.gov.br/documents/10181/5389382/%286%29RDC_301_2019_COMP.pdf/7d991c04-e7a1-4957-aed5-3689c62913b2)

Sangshetti, J.N., Deshpande, M., Zaheer, Z., Shinde, D.B., Arote, R. Quality by design approach: Regulatory need. *Arabian Journal of Chemistry*. 10: S3412–S3425. 2017.

Stockdale, G.W., Cheng, A. Finding Design Space and a Reliable Operating Region Using a Multivariate Bayesian Approach with Experimental Design. *Quality Technology & Quantitative Management*. 6: 391–408. 2009.

Zhang, L., Mao, S. Application of quality by design in the current drug development. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 12: 1–8. 2017.

# 7

## Aplicação de sistemas bifásicos no particionamento e purificação de bioativos farmacêuticos

Filipe Smith Buarque<sup>1,2</sup>

Paulo Sérgio Santos Sobral<sup>1,2</sup>

Kênia Marcatti Sousa<sup>1,2</sup>

Paula Gabrielle Campos Gomes<sup>1,2</sup>

Ranyere Lucena de Souza<sup>1,2</sup>

Álvaro Silva Lima<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Universidade Tiradentes –  
Av. Murilo Dantas 300, Farolândia. Aracaju Sergipe, Brasil. 49032-490.

<sup>2</sup> Instituto de Tecnologia e Pesquisa – Av. Murilo Dantas 300, Prédio do ITP,  
Farolândia. Aracaju Sergipe, Brasil. 49032-490.



# RESUMO

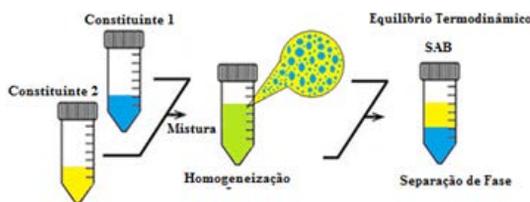
Várias técnicas de separação e purificação de biomoléculas, de interesse à área farmacêutica, são propostas na literatura e aplicadas aos diferentes processos industriais. Uma técnica promissora devido à simplicidade do uso e à biocompatibilidade são os sistemas aquosos bifásicos, os quais podem ser formados em meio aquoso com teor de água superior à 50% (m/m) nas fases coexistentes. Duas outras possibilidades surgem quando a premissa de elevado teor de água é quebrada surge os sistemas bifásicos, ou quando há a substituição integral da água por etanol dando origem aos sistemas etanólicos bifásicos. Neste sentido, apresenta-se aqui o arcabouço teórico da formação dos sistemas e seus diagramas, seguido da aplicação no particionamento, concentração e purificação de diferentes biomoléculas com aplicação na indústria farmacêutica.

## 7.1 INTRODUÇÃO

### 7.1.1 Sistemas Aquosos Bifásicos

Sistema Aquoso Bifásico (SAB) pode ser definido como um procedimento de separação, concentração e purificação de moléculas baseado no equilíbrio líquido-líquido, no qual um par de constituintes solubilizados em água são misturados acima de uma concentração crítica, e separam-se em duas fases (Figura 7.1). As fases de topo e fundo coexistente são compostas pelos três constituintes, contudo um desses apresenta em maior concentração.

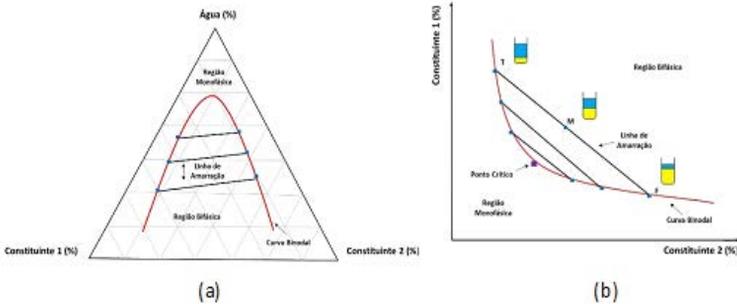
**Figura 7.1.** Formação dos sistemas aquosos bifásico



Os diagramas de fases oferecem informações acerca da concentração de constituintes necessária para a separação das fases a um dado valor de pH e temperatura. Estes diagramas (Figura 7.2) são compostos pela curva binodal, obtida pela união das composições da fase de topo (ponto T) e fase de fundo (ponto F) oriundos da separação de fases para uma composição de mistura (ponto M) específica. A união dos pontos T-M-F forma a linha de amarração (TL, do inglês *tie-line*), as quais devem ser paralelas. Quanto mais afastado da origem do eixo maior a área bifásica e maior o comprimento da linha de amarração (TLL, do inglês *tie line length*). Quanto maior o comprimento da linha de amarração maior será a diferença de composição entre as fases de topo e fundo, entretanto quando essas composições são semelhantes

tempos o ponto crítico (PC). Sobre uma mesma linha de amarração, as composições das fases de topo e de fundo serão similares entre si, contudo os volumes de cada fase serão diferentes.

**Figura 7.2.** Representação triangular (a) e cartesiana (b) para os diagramas de fases.



Para a determinação da curva binodal pode-se usar algumas metodologias. Destacamos aquelas que determinam a composição dos constituintes na fase de topo e de fundo, seguida da construção gráfica e a binodal representada pela ligação dos pontos. A outra metodologia denominada de ponto de turvação (do inglês *cloud point*) baseia-se na aplicação de gota a gota do constituinte que atua como agente *salting-out* na solução do outro componente até a percepção de uma turvação (área bifásico) e depois desturvação gota a gota com água (área monofásica). O processo é repetido tantas vezes quanto possível para formar a curva binodal. Uma vez determinados os pontos da curva binodal, algumas correlações empíricas são utilizadas para ajustar os pontos experimentais, como apresentada na Tabela 7.1:

**Tabela 7.1.** Correlações para determinação das curvas binodais

Correlação	Parâmetros de ajuste	Referência
$Y = A \times \exp(BX^{0.5} - CX^3)$	A, B e C	Merchuck et al., 1998
$Y = y_0 + \frac{a}{1 + \exp\left(\frac{X - x_0}{b}\right)}$	a, b, $x_0$ e $y_0$	Tubio et al., 2009
$Y = A + BX + CX^{0.5}$	A, B e C	Regupathi et al., 2009
$Y = A \times BX^{0.5} + CX + DX^2$		Hu et al., 2003
$Y = A \times BX + CX^2 + DX^3$	A, B, C e D	Saravanan et al., 2006

Y and X são as concentrações dos constituintes mais encontrados na fase de topo e fundo, respectivamente

Para a construção das linhas de amarração, pontos são previamente determinados na região bifásica de cada curva binodal. Assim, os constituintes do sistema são pesados, posteriormente agitados vigorosamente e centrifugados. Após o estágio de equilíbrio, as fases tornaram-se claras e a interface bem definida. Por fim, ambas as fases são separadas, pesadas e seus volumes determinados. A determinação da linha de amarração é realizada resolvendo o seguinte sistema de quatro equações (Equações 7.1- 7.4):

$$[Y]_{\text{T}} = A \times \exp(B[X]_{\text{T}}^{0.5}) - (C[X]_{\text{T}}^3) \tag{7.1}$$

$$[Y]_{\text{B}} = A \times \exp(B[X]_{\text{B}}^{0.5}) - (C[X]_{\text{B}}^3) \tag{7.2}$$

$$[X]_{\text{T}} = \left(\frac{[X]_{\text{M}}}{\alpha}\right) - \left(\frac{1-\alpha}{\alpha}\right) [X]_{\text{B}} \tag{7.3}$$

$$[Y]_{\text{T}} = \left(\frac{[Y]_{\text{M}}}{\alpha}\right) - \left(\frac{1-\alpha}{\alpha}\right) [Y]_{\text{B}} \tag{7.4}$$

As TLL podem estar correlacionadas as massas das fases e são determinados pela equação 7.5.

$$TLL = \sqrt{(Y_T - Y_F)^2 + (X_T - X_F)^2} \quad (7.5)$$

Quando o trabalho experimental para determinação das TLs é bem executado, estas apresentam-se paralelas e, portanto, a inclinação da linha de amarração (do inglês slope tie-line) é constante e segue a equação 7.6.

$$STL = \frac{Y_T - Y_F}{X_T - X_F} = \frac{\Delta Y}{\Delta X} \quad (7.6)$$

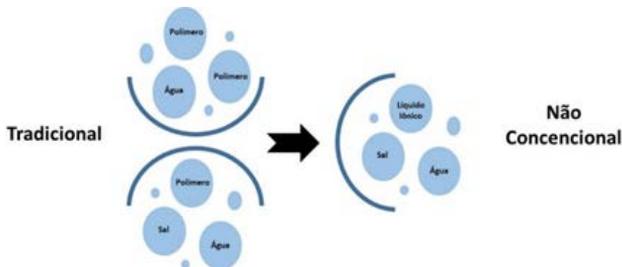
Aires-Barros e colaboradores aplicaram a análise de força, oportunidades, fraquezas e ameaças (fofa, do inglês *strenghts, weakness, opportunites and threats - swot*) para a aplicação na separação industrial, cujos destaques encontram-se na Figura 7.3. As forças do SAB estão inicialmente associadas a possibilidade de integrar o processo a outros procedimentos operacionais como extrações (*upstream*) e passos de purificação como precipitação, diálise, microfiltração e cromatografia (*downstream*). Para tanto, vantagens adicionais como a biocompatibilidade devido ao alto conteúdo de água nas fases coexistentes fornecendo um ambiente compatível ao ambiente biológico (Johansson *et al.*, 1998). A seletividade destes sistemas pode ser aumentada pela adequada escolha dos diferentes pares de constituintes (Chao *et al.*, 2010), adição de adjuvantes ao processo (Rosário *et al.*, 2019), e ainda pela utilização de ligantes seletivos que favorece a migração da molécula alvo para uma das fases (Ruiz-Ruiz *et al.*, 2012).

**Figura 7.3.** Apresentação resumida das forças, oportunidades, fraquezas e ameaças para processos de *downstream* de biomoléculas utilizando SAB.



Um número expressivo de pares de constituintes é capaz de gerar SAB, os quais podemos classificar como sistemas tradicionais e os não convencionais como mostra a Figura

**Figura 7.4.** Classificação dos Sistemas Aquosos Bifásicos quanto à tradicionalidade dos constituintes



Os pares de constituintes tradicionais são os formados por polímero-polímero tais como Dextrana + Ucon (Madeira *et al.*, 2008) e dextrana + polietilenoglicol – PEG (Grohman *et al.*, 1995), contudo,

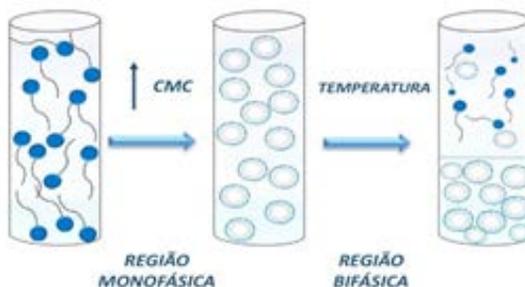
desvantagens como o custo e a viscosidade da dextrana possibilitou a substituição de um deles por um polímero sintético como o sistema baseado em polímero-sais como por exemplo PEG + fosfato (Lei *et al.*, 1990). Desde 2003, a literatura vem demonstrando a possibilidade de formação de sistemas utilizando líquidos iônicos – LI (Gutowski *et al.*, 2003) e solventes eutéticos profundos – do inglês *deep eutectic solvents - DES* (Zeng *et al.*, 2014). Os líquidos iônicos caracterizam-se como solventes alternativos que apresentam ponto de fusão abaixo de 100 °C. Estes compostos são formados por cátions (família catiônica – imidazólio, piridínio, piperidínio, piperidínio, amônio, fosfônio, entre outros) com cadeia alquílica de ampla variedade (costumeiramente C<sub>2</sub> a C<sub>10</sub>), e por um ânion orgânico (acetato) ou inorgânico (cloreto, brometo, etc.), que apresentam interessante propriedades como a negligenciável volatilidade e não inflamabilidade (Freire *et al.*, 2012). Os sistemas não tradicionais baseados em LI foram amplamente estudados na literatura devido a maior variedade de possibilidades de formação de estruturas diferentes decorrentes da combinação de cátions e ânions (10<sup>12</sup> possibilidades) associadas a possibilidade de ajustes de suas propriedades como polaridade e hidrofobicidade, as necessidades do sistema, o que confere a este solvente a denominação e designer solvents. Já os DES estão na classe de solventes emergentes relacionados aos líquidos iônicos, que foram primeiramente observados por Abbott *et al* (2003) ao misturar cloreto de colina sólido (ponto de fusão, T<sub>f</sub> ≈ 302 °C) com ureia cristalina (T<sub>f</sub> ≈ 133 °C) na proporção 1:2, observando uma depressão profunda do ponto de fusão (12 °C).

A produção mundial de artigos científicos recuperados na base de dados Scopus usando o descritor em inglês “Aqueous two-phase system” entre 2000-2022 foi de 53.867 artigos dos quais 39.968 foram publicados no intervalo de 2010 à 2022. Deste total, 28,6% referenciam a utilização de líquidos iônicos (2010 a 2022), passando para 31,4% entre 2010 a 2022 e praticamente constante nos últimos anos 32,4% (2015 a 2022). Portanto, observa-se a importância deste solvente na publicação mundial de artigos sobre sistemas aquosos bifásicos.

## 7.1.2 Sistemas Aquosos Bifásicos Micelares

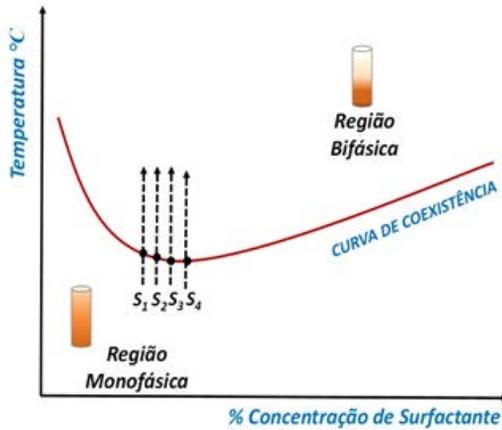
Os Sistemas aquosos bifásicos micelares (SABM), possuem um grande potencial na separação de biocompostos. Os SABM são formados quando combinamos surfactantes e água/sais; isso ocorre quando os surfactantes são adicionados em determinadas concentrações (acima da concentração micelar crítica- CMC) e submetidos a temperatura. Dessa forma, obtém-se duas fases líquidas macroscopicamente, na qual uma fase rica em surfactante irá estar em equilíbrio com outra fase líquida pobre em surfactante (Figura 7.5) (Vicente *et al.*, 2017).

**Figura 7.5.** Representação esquemática da formação de um SABM.



Assim, esse processo ocorre acima de uma temperatura que denominamos como cloud point. As temperaturas de cloud point formam a curva de coexistência (Figura 7.6) que correspondem o limite entre a região monofásica e bifásica do sistema (Vicente *et al.*, 2017).

**Figura 7.6.** Representação gráfica da curva de coexistência para um SABM. Acima da curva de coexistência exibe duas fases macroscópicas e abaixo apenas uma única fase.



Tais sistemas possuem algumas particularidades, uma delas é que necessitam apenas de um surfactante e água para serem formados, tornando o processo mais verde e mais biocompatível do que os processos de extração líquido-líquido, baseados em solventes orgânicos. Além disso, possuem baixo custo, alto fator de recuperação, preservação das propriedades biológicas da molécula alvo, e também possuem capacidade de manipular o sistema, visto que possuem uma diferença significativa de polaridade entre as fases (Torres *et al.*, 2017; Cordisco *et al.*, 2016).

### 7.1.3 Sistemas Bifásicos

Industrialmente, a aplicação dos SAB não é efetiva devido aos custos associados com os constituintes das fases, bem como o manuseio, descarte e pós-uso desses componentes (Rosa *et al.*, 2011). Alguns artigos vêm trabalhando com a possibilidade de reciclar os líquidos iônicos das fases por aplicação do conhecimento de suas propriedades como a solubilidade e hidrofobicidade. Essa necessidade de reciclo

também é sustentada pelas questões ambientais e não acumular este constituinte em correntes de efluentes. Freire *et al* (2012) utiliza solução aquosa de carbonato de sódio para recuperar e reciclar o líquido iônico. Enquanto Jiang *et al.* (2007) utilizam um segundo líquido iônico para fazer a separação das fases remover a penicilina e recupera o líquido iônico. Contudo, esses processos são mais complexos, necessitando ainda de maior volume de estudos.

Para suplantarmos essa desvantagem, alguns autores propuseram sistemas formados por solventes orgânicos (álcoois – metanol, etanol, 1-propanol e 2-propanol; acetonitrila, tetrahydrofurano, dentre outros) combinados com sais (Reis *et al.*, 2012); carboidratos (Cardoso *et al.*, 2013; Souza *et al.*, 2017), polióis (Cardoso *et al.*, 2014; Souza *et al.*, 2016), polímeros (Cardoso *et al.*, 2015) e líquidos iônicos (Souza *et al.*, 2015; Santos *et al.*, 2016; Souza *et al.*, 2018; Plácido *et al.*, 2018; Câmelos *et al.*, 2020). Contudo, a premissa de se ter 50% de água em cada fase coexistente não é observada para todos os pontos de mistura, como apresentado na Tabela 7.1 de composição para sistema formados por etanol + sais de fosfato + água à 25°C e pressão atmosférica. Neste exemplo apenas o sistema etanol (29,92 %, m/m) +  $K_3PO_4$  (14,95 %, m/m) +  $H_2O$  (55,13 %, m/m) e etanol (24,84 %, m/m) +  $K_3PO_4$  (14,87 %, m/m) +  $H_2O$  (60,29 %, m/m) podem ser denominados de aquosos, nos demais a premissa não é cumprida, portanto podemos denominá-los apenas de sistemas bifásicos.

**Tabela 7.2.** Composição de fases para sistemas etanol + sais de fosfato + água à 25°C e pressão atmosférica.

Sal	Ponto de Mistura			Fase de Topo			Fase de Fundo		
	[Etanol]	[Sal]	[H <sub>2</sub> O]	[Etanol]	[Sal]	[H <sub>2</sub> O]	[Etanol]	[Sal]	[H <sub>2</sub> O]
K <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	29,92	14,95	55,13	45,52	4,49	52,99	12,17	29,70	58,13
	34,81	20,52	44,67	60,74	1,27	37,99	8,10	40,35	51,55
	29,65	20,44	49,91	53,30	2,22	44,8	9,62	35,87	54,51
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	24,84	14,87	60,29	33,48	6,86	59,66	9,15	29,43	61,42
	35,01	19,84	45,15	59,34	1,91	38,75	5,73	41,4	52,87
Tampão	39,92	19,97	40,11	57,73	3,06	39,21	8,43	49,88	41,69
	45,02	19,94	35,04	66,09	1,9	32,01	8,07	51,58	40,35

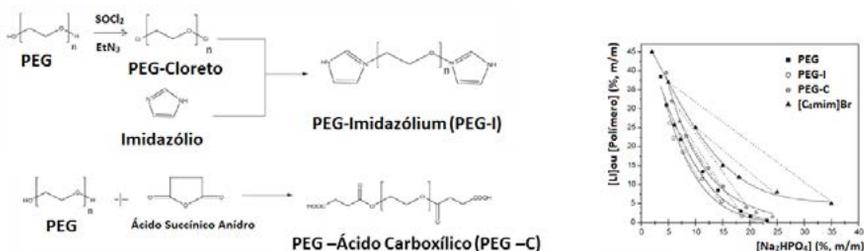
Tampão: KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>. Fonte: Reis *et al.*, 2012

## 7.1.4 Sistemas Etanólicos Bifásicos

Os SABs têm como característica a elevada hidroflicidade, portanto aplicados nas separações de moléculas com afinidade para água. As moléculas alvo com característica hidrofóbica podem ser aplicadas nos SAB em pequenas quantidades para evitar sua precipitação na interface do sistema. Algumas alternativas puderam ser empregadas ao longo dos aos como a adição de sais como NaCl ao sistema, permitindo o aumento da diferença de hidrofobicidade entres as fases (Lee e Sandler, 1990).

Outro caminho é a funcionalização do polímero como o PEG proposta por Jiang *et al.* (2009), apresentada na Figura 7.7. Neste caso, o polímero pode ter suas características aumentada (PEG-Ácido Carboxílico – PE-C), ou adquirir características hidrofóbicas (PEG-imidazólio – PEG-I). Nos SABs formado por Polímero ou LI + Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, o sal atua como o agente salting-out. Portanto, o sistema que tem área bifásica maior é formado pelo constituinte mais hidrofóbico. Percebe-se que, em comparação com o sistema utilizando PEG, a funcionalização PEG-C tem área bifásica menor enquanto a um deslocamento da curva binodal em direção à origem quando utiliza-se a funcionalização PEG-I.

**Figura 7.7.** Funcionalização da estrutura do polietilenoglicol e sua correspondente influência na formação de sistemas bifásicos.



Fonte: Jiang *et al.*, 2009

Recentemente, o grupo de Lima e colaboradores (Buarque *et al.*, 2021) substituiu integralmente a água do sistema por etanol, criando um sistema isento de água e nomeado por sistema etanólico bifásico (SEB). O SEB consiste em duas fases etanolicas imiscíveis formadas pela dissolução de dois componentes em etanol e acima de concentrações específicas sofre desmistificação líquido-líquido. Assim, os SEBs aparecem como alternativas sustentáveis e biocompatíveis para processos de extração líquido-líquido mais convencionais, bem como viabilidade de expansão e capacidade de integração de processos. Este sistema pode ser usado como uma técnica para a separação, purificação e recuperação de diferentes biomoléculas hidrofóbicas. Buarque *et al.* (2021) relataram sistemas formados por PPG + etilenoglicóis + etanol e PPG + LI + etanol à 25°C e pressão atmosférica. A constituição destes sistemas é a grande limitação pois os constituintes mais utilizados no SAB não são ou são pouco solúveis em etanol. A representação pode ser realizada em sistemas triangulares ou cartesianos, e as definições aplicadas para SAB podem também aqui ser utilizadas. Os sistemas propostos foram capazes de particionar seletivamente biomoléculas de características antagônicas como a bixina (modelo hidrofóbico) e o ácido ascórbico (modelo hidrofílico). A bixina migrou em sua totalidade para a fase de topo, enquanto que o ácido ascórbico foi quantificado em maior concentração na fase de fundo.

## 7.2 PARTIÇÃO E PURIFICAÇÃO DE BIOATIVOS

A utilização de moléculas bioativas tem demandado grandes esforços para a sua extração e subsequente purificação. Vários procedimentos têm sido empregados como a precipitação (Villanueva-Bermejo *et al.*, 2017), cromatografia (Vichapong *et al.*, 2010) e os sistemas bifásicos (Oliveira *et al.*, 2018). É preciso estar em mente que a escolha de um processo de purificação deve levar em conta a manutenção da atividade biológica do bioativo. Vale ressaltar que o grau de purificação desejado está associado à aplicação do produto. O impacto do custo total no processo de produção depende expressivamente do tipo de produto que se quer obter e da concentração de produto obtida ao final do processo. Para uso técnico e industrial, as disponíveis no mercado são preparações pouco purificadas, mas para uso farmacêutico e analítico é necessário obter preparações com alto grau de pureza, e normalmente representam até 80% dos custos operacionais (Molino *et al.*, 2013). A ideia fundamental a respeito dos processos de purificação é que além de obtenção de altos percentuais de pureza ele precisa ser simples e de baixo custo para ter viabilidade técnica e financeira, sendo que isso nem sempre é possível. Assim, a realização de estudos visando o desenvolvimento e aprimoramento de técnicas para extração e purificação de biocompostos tem se intensificado com o intuito de atender à crescente demanda do setor industrial (Soares *et al.*, 2015).

Alguns parâmetros são utilizados para avaliar a partição e a purificação de biomoléculas. Dentre eles destacam-se o coeficiente de partição (K) que é determinado através da razão entre a concentração de cada biomolécula nas fases de topo e fundo dos sistemas, conforme descrito na equação 7.7. A eficiência da extração (EE%) que é definida como a fração entre a concentração da biomolécula na fase no qual é preferencialmente particionada (topo ou fundo) pela mistura total, equação 7.8 e 7.9. A seletividade (S) que é definida como a razão entre o coeficiente de partição (K) de duas biomoléculas (equação 7.10) e o fator de purificação no qual é definido pela razão entre a concentração da biomolécula na fase para qual é particionada pela concentração específica presente no extrato bruto (equação 7.11 e 7.12).

$$K = \frac{[C]_T}{[C]_B} \quad (7.7)$$

$$EE\%_T = \frac{C_T \times V_T}{C_T \times V_T + C_F \times V_F} \quad (7.8)$$

$$EE\%_F = \frac{C_F \times V_F}{C_F \times V_F + C_T \times V_T} \quad (7.9)$$

$$S = \frac{K_i}{K_j} \quad (7.10)$$

$$CE = \frac{C_{Biomol}}{C_{Contam}} \quad (7.11)$$

$$FP = \frac{CE_T}{CE_E} \quad (7.12)$$

onde:  $C_T$  e  $C_F$  é a concentração no topo e no fundo, respectivamente.  $V_T$  e  $V_F$  é o volume no topo e no fundo, respectivamente. CE é a concentração específica,  $C_{Biomol}$  representa a concentração da biomolécula,  $C_{Contam}$  é a concentração de contaminantes presentes no extrato e os subscritos T e E são indicativos do topo e extrato bruto proveniente da biomassa, respectivamente.

Uma vez que se conhecem esses parâmetros, alguns exemplos de aplicações de particionamento e purificação de diferentes biomoléculas com potencial para aplicação na indústria farmacêutica vai ser apresentado.

## 7.2.1 Partição e Purificação de Compostos Fenólicos

Os compostos fenólicos constituem um dos grupos de substâncias mais numerosos e amplamente distribuídos no reino vegetal, com mais de 10.000 estruturas quimicamente heterogêneas (Alu'datt *et al.*, 2017). Os fenólicos são um grupo de compostos bastante presentes no dia, a dia, já que muito do sabor, odor e coloração de diversos vegetais são gerados por estes, podendo também ser divididos em dois grandes grupos: os flavonoides e não flavonoides (Paz *et al.*, 2015). Os flavonoides são formados por dois anéis aromáticos unidos por um heterociclo oxigenado. Encontram-se geralmente ligados a açúcares, formando glicosídeos (Alberti *et al.*, 2017). Os ácidos fenólicos (não flavonoides) caracterizam-se pela presença de um anel benzênico, um grupamento carboxílico e um ou mais grupamentos de hidroxila e/ou metoxila na molécula (Giada, 2013). Pesquisas têm demonstrado que os compostos fenólicos apresentam grande interesse nutricional por contribuir com propriedades anticancerígenas, antioxidante, hipoglicêmico, efeitos cardioprotetores e vasodilatadores, hipolipídico e anti-inflamatório, já que estão relacionados com a capacidade antioxidativa (Belmiro *et al.*, 2017).

Alguns estudos demonstraram que SAB, formados com diferentes composições, têm sido aplicados à extração e purificação de um grande número de compostos fenólicos, incluindo vanilina, ácido ascórbico, rutina, ácido gálico e antocianinas. Três fenômenos distintos são capazes de interferir nos resultados de partição desses bioativos como, solubilidade das mesmas em cada uma das fases, o efeito *salting-out* e o efeito do pH (Reis *et al.*, 2012; Reis *et al.*, 2014; Reis *et al.*, 2015). Diversos trabalhos tem sido publicados na literatura para extração e purificação de fenólicos, por exemplo, Reis *et al.* (2014) extraíram rutina a partir de resíduos de acerola por SAB utilizando um sistema composto por álcool e sais. O maior coeficiente de partição (51,47) e eficiência de extração (98,64%) foram obtidos em SAB composto por 1-propanol +  $K_2HPO_4/KH_2PO_4$ . Tan *et al.* (2014) separaram e purificaram ácido clorogênico (CGA), a partir da folha de rami (*Boehmeria nivea*), utilizando SAB

composto por etanol e  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ . Os resultados mostraram que o CGA migrou, preferencialmente, para a fase rica em álcool com um rendimento de 95,76% à pH 3,29.

Com o intuito de extrair a vanilina utilizando SAB baseados em acetonitrila, Cardoso *et al.* (2014 e 2015) abordou o potencial de formação de SAB composto de polióis (glicerol, eritritol, xilitol, sorbitol e maltitol) e polivinilálcool – PVA (9000-10.000, 13.000-23.000, 31.000-50.000). Os resultados mostraram que a vanilina migrou para a fase rica em acetonitrila com recuperação acima de 89% para SAB formado por polióis e de 79% para sistemas formado por PVA (Cardoso *et al.* 2014 e Cardoso *et al.* 2015).

Santos *et al.* (2016) na recuperação da capsaicina da *Capsicum frutescences* aplicou um SAB composto por acetonitrila e líquidos iônicos baseados em sais de colina. No particionamento a capsaicina migrou para a fase de topo rica em acetonitrila, onde alcançaram uma eficiência de extração e um fator de purificação de 91% e 3,2, respectivamente. Oliveira *et al.* (2018) conseguiram formar SABs baseados em acetonitrila e polivinilpirrolidina (PVP) visando o particionamento de 3 moléculas, o cloridrato de cianidina 3-O-glucoside, ácido gálico e quercetina. Os autores observaram que o ácido gálico e a quercetina migraram para a fase rica em PVP, a cianidina migrou para a fase rica em acetonitrila (96% de eficiência de extração). Wang *et al.* (2016) estudaram um SAB composto por líquidos iônicos à base de colina e  $\text{K}_3\text{PO}_4$  para extrair e purificar flavonoides. As condições ótimas do sistema resultaram num rendimento de 1,33% e uma purificação de 20 vezes de flavonoides total.

Apesar dos SAB ter sido amplamente estudados, o aumento de escala ainda apresenta dificuldades em manter os altos rendimentos e os níveis de pureza obtidos em escala laboratoriais. Para este fim, a cromatografia de partição centrífuga (CPC) pode melhorar a resolução das separações e SAB em processos escaláveis para grandes taxas de fluxo. CPC é capaz de melhorar o desempenho da purificação em fluxo contínuo, além de permitir a separação de moléculas estruturalmente semelhantes em um regime contínuo. Esta tecnologia cromatográfica a jusante opera com fases líquidas estacionárias e móveis, no qual corresponde às duas fases

do SAB. A fase estacionária é imobilizada por uma forte força centrífuga enquanto a fase móvel é bombeada através da fase estacionária, permitindo um processo de separação em vários estágios pela partição contínua das biomoléculas entre as duas fases (Santos *et al.*, 2018; Santos *et al.*, 2019; Lima *et al.*, 2021; Soares *et al.*, 2021).

Santos *et al.* (2018) relatou o uso de CPC para separação de diferentes compostos fenólicos (ácidos caféico, ferúlico e protocatecúico; vanilina e siringaldeído), utilizando SAB baseados em polímero. Por fim, a recuperação dos compostos fenólicos foi entre 65 e 87%, uma pureza de até 95%, além de altos valores de seletividades. Lima *et al.* (2021) demonstraram o uso de CPC em SAB baseados em líquidos iônicos para extrair e purificar antocianinas a partir do bagaço de uva. Os autores observaram que através de SAB foi encontrado uma purificação de 23,9 para esta biomolécula. Contudo, ao se usar o CPC a purificação de antocianinas aumentou para 44,9. Esses resultados sugerem o uso potencial de CPC para purificar de biomoléculas.

Os sistemas aquosos bifásicos micelares (SABM) também vem sendo amplamente aplicados para obtenção de compostos antioxidantes. Alguns trabalhos tem sido relatados na literatura para extração e purificação de compostos fenólicos a partir destes sistemas, por exemplo Lee *et al.* (2019), realizou extração de compostos fenólicos totais a partir das folhas de mamão, utilizando SABM baseado na série dos Pluronic (L-121, L-81, L-61 e L31). Dos surfactantes investigados o Pluronic L-121 foi que mostrou a temperatura de cloud point mais baixa, seguindo do Pluronic L-81, Pluronic L-61 e Pluronic L-31. No particionamento desses sistemas foi observado que os compostos fenólicos migraram preferencialmente para fase rica em surfactante.

Padilha *et al.* (2018), desenvolveu um estudo para observar o potencial de separação de polifenóis (ácido gálico, quercetina, catequina, ácido vanílico, ácido siríngico e vanilina) em resíduos industriais de camu-camu baseado na extração no ponto de nuvem. Nesse sistema, foi aplicado um surfactante não iônico (Triton X- 114) e sal cloreto de sódio, esse sistema permitiu concentrar os polifenóis na fase rica em surfactante, obtendo uma eficiência de extração máxima de 95,71%.

Desse modo, os autores concluíram que a técnica é eficiente para extração de resíduos agroindustriais por ser simples, de baixo custo e ter uma eficiência de extração elevada. Leite *et al.* (2018), aplicou o SABM para extrair a clorofila das folhas de espinafre utilizando o surfactante não iônico. Os autores utilizaram planejamento experimental para obter a melhor condição de extração, alcançando a um rendimento máximo de 0,94 mg/g. Após a etapa da extração, o extrato livre foi submetido a temperatura que promoveu a separação das fases. Posteriormente foi verificado, que a clorofila migrou para fase rica em surfactante e obteve uma recuperação de 97%. Logo, os autores confirmaram o potencial dessa técnica para extração de biocompostos hidrofóbicos com aplicação na área de cosmética e nutracêuticas.

Gomes *et al.* (2020), desenvolveu um processo integrativo para obtenção de dois compostos antioxidantes (clorofila, compostos fenólicos totais e ácido rosmarínico) a partir da folha de alecrim. Nesse estudo foi aplicada técnica de extração com agitação e purificação utilizando SABM (Sistema aquoso bifásico micelar) e SAB (Sistema aquoso bifásico). A purificação da clorofila foi obtida através do SABM baseado em tampão fosfato e Triton X-100, os resultados mostraram uma concentração máxima da biomolécula de 3,7 vezes na fase rica em surfactante. Já o ácido rosmarínico foi purificado utilizando o SAB baseado em solvente orgânico e  $K_3PO_4$ , para todos os sistemas estudados a biomolécula migrou totalmente para fase que contém solvente. O maior fator de purificação foi encontrado usando o sistema com base em acetonitrila (50% em peso) +  $K_3PO_4$  (20% em peso).

## 7.2.2 Partição e Concentração de Hormônios Femininos

Os hormônios podem ser naturais (estrogênios, andrógenos e progesterona) ou sintéticos. Os hormônios naturais são substâncias biologicamente ativas sintetizadas pelo colesterol e excretadas por seres humanos e animais (Guedes-Alonso *et al.*, 2014). Hormônios sintéticos, encontrados em fármacos, são esteroides que tiveram suas estruturas moleculares alteradas (Quinete *et al.*, 2015). A intensa utilização

de hormônios deve-se ao consumo global de estrogênios que nos últimos 50 anos aumentou exponencialmente devido ao seu uso como contraceptivos, terapias da menopausa, tratamento para alguns cânceres humanos e promotores de crescimento veterinário (Silva *et al.*, 2012). Os estrogênios são atualmente considerados os medicamentos mais prescritos no mundo (Guedes-Alonso *et al.*, 2014). Na espécie humana, os hormônios podem causar alteração do sistema hormonal, presença de câncer nos testículos, próstata e câncer de mama (Kabir *et al.*, 2015).

Várias técnicas analíticas foram utilizadas para a determinação de hormônios sendo baseadas em cromatografia gasosa-espectroscopia de massa (Caban *et al.*, 2015), cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a massa (LC-MS / MS) (Guedes-Alonso *et al.*, 2014). Vale ressaltar que o baixo teor desses micropoluentes torna inviável sua identificação e quantificação, o que constitui uma grande desvantagem na avaliação de sua persistência e seu impacto ambiental. Portanto, requerem uma metodologia de concentração, que normalmente utiliza-se a extração em fase sólida (Quinete *et al.*, 2015). Assim, uma alternativa à extração e concentração com vantagens significativas sobre os métodos convencionais é o uso de sistemas aquosos bifásicos (SAB) (Passos *et al.*, 2012).

O alto desempenho do SAB como plataforma de extração e concentração é apoiado por estudos já publicados na literatura. Por exemplo, Passos *et al.* (2012) estudaram a capacidade de vários líquidos iônicos hidrofílicos combinados com o  $K_3PO_4$  como constituintes do SAB para extração e concentração de Bisfenol A (BPA). Eficiências de extração de 100% (para a fase rica em LI) e fator de concentração de 100 vezes foram obtidas para o BPA a partir de urina humana. Estes resultados refletem a baixa afinidade do BPA pela água e pela preferência do particionamento para fases mais hidrofóbicas. Entretanto, as altas eficiências de extração obtidas também são um resultado direto da forte capacidade de salga do  $K_3PO_4$ , o que leva à "exclusão" do BPA da fase rica em sal inorgânico para a fase rica em líquido iônico.

Dinis *et al.* (2015) verificaram o uso de SAB compostos por LIs e um sal orgânico biodegradável como estratégia de extração e

concentração para 17 $\alpha$ -etinilestradiol (EE2) para posterior identificação e quantificação em águas residuais. Eficiências de extração de 100% e um fator de concentração de 1000 vezes foram obtidas para a fase rica em LI em sistemas formados por [C4mim][N(CN)2] + KNaC<sub>4</sub>H<sub>4</sub>O<sub>6</sub>, o que confirma a hidrofobicidade desse composto (logKow = 4,15). A metodologia proposta permite aumentar a concentração de EE2 em três ordens de grandeza (de ng/L a  $\mu$ g/L) e, assim, superar os limites de detecção de equipamentos analíticos convencionais comumente usados na análise e monitoramento de águas residuais.

Díaz-Quiroz *et al.* (2020a) avaliaram a extração e concentração de 17 $\beta$ -estradiol (E2) a partir de amostras de soro suíno por diferentes SAB formados por líquidos iônicos e sal de citrato. O E2 migra aproximadamente 90% para a fase rica em LI no sistema composto por alanoato de colina ([Ch][Ala]) + citrato de sódio com um fator de concentração de 6,6 foi obtido para as amostras. Estes resultados sugerem que a interação com o líquido iônico é considerada de maior importância devido à maior afinidade do E2 (log Kow = 4,01) para fases mais hidrofóbicas. Em outro estudo publicado por Díaz-Quiroz *et al.* (2020b) os autores demonstraram a capacidade de extrair E2 em SAB baseado em LI (alaninato de colina - N1112OHAla) + surfactante (Triton X-100). Neste estudo o E2 migra preferencialmente para a fase rica em surfactante, com uma eficiência de extração próxima também de 90%, provavelmente devido à interação com as porções hidrofóbicas alifáticas do Triton X-100. De acordo com o pH (> 11) e pKa, provavelmente o E2 está na sua forma aniônica, e assim, complexação de íons desempenhariam um papel fundamental, juntamente com a ligação de hidrogênio, a interação de hidrofobicidade e a ligação por afinidade.

## 7.2.3 Partição e Concentração de Antibióticos e Antidepressivos

Antibióticos são substâncias naturais (produzidas por fungos ou bactérias) ou sintéticas, que atuam inibindo o crescimento ou causando a morte de fungos ou bactérias (HUANG *et al.*, 2020). Desde a sua descoberta, os antibióticos (amoxicilina, cefalexina, ciprofloxacina,

neomicina, azitromicina, doxiciclina, metronidazol, dentre diversos outros) têm sido amplamente utilizados e são indispensáveis para procedimentos médicos como cirurgia, transplante de órgãos e para prevenir e tratar uma infinidade de doenças infecciosas, em humanos e animais (Shin *et al.*, 2020, Singh *et al.*, 2020). Os antidepressivos são medicamentos amplamente utilizados no tratamento de doenças psiquiátricas ou psicológicas como, depressão, distúrbios compulsivos, transtorno do pânico, ansiedade e fobia social (Schultz *et al.*, 2008). Os antidepressivos inibidores seletivos da recaptação da serotonina (cloridrato de fluoxetina, citalopram, cloridrato de paroxetina, cloridrato de sertralina, fluvoxamina, escitalopram, dentre outros), correspondem a mais de 80% do mercado de antidepressivos (Robert *et al.*, 2017). Outro antidepressivo bastante prescrito, tanto para humanos quanto para animais é o cloridrato de amitriptilina, medicamento tricíclico, possui esse nome devido a presença de três anéis de carbono (Khan *et al.*, 2016, Rub *et al.*, 2020).

As técnicas utilizadas para garantir a detecção e extração de contaminantes em baixas concentrações em águas possuem custo elevado, tanto pela tecnologia aplicada aos equipamentos e operação dos mesmos, quanto pela preparação de amostras. Todas as técnicas necessitam de amostras pré-concentradas para obtenção de bons resultados. Essas técnicas estão fundamentadas em cromatografia gasosa-espectroscopia de massa (GC-MS) (Caban *et al.*, 2015), cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC) (Verbinnen *et al.*, 2010), cromatografia líquida acoplada a espectroscopia de massa (LC-MS / MS) (Sodré *et al.*, 2010, Alonso *et al.*, 2014). No entanto, como uma alternativa a estas técnicas, o SAB pode ser utilizada e consiste em uma tecnologia interessante de extração, separação e recuperação de compostos em soluções aquosas.

O sistema etanol e 2-propanol  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , a recuperação e a eficiência de extração para o antibiótico tetraciclina, podem atingir 30,03% e 87,70%, respectivamente em pH 1,52 e 0,50 g/mL  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . A partição das moléculas alvo para a fase superior foi influenciada pelo tipo de álcool, pela concentração de sal (efeito *salting-out*), pelo pH e pela temperatura do sistema (Wang *et al.*, 2010).

O sistema formado por líquido iônico ( $N_{1112}OHAla$ ) e triton-100, demonstraram capacidade para extrair os seguintes antibióticos: oxitetraciclina, clortetraciclina, ciprofloxacina e enrofloxacina. A extração das moléculas foi dependente da concentração de sal (efeito salting-out), e a adição de um surfactante catiônico com adjuvante permitiu melhorar os valores de extração a níveis superiores a 90% (Díaz-Quiroz *et al.*, 2020b). Nos sistemas formados por líquidos iônicos ( $[N_{4444}]Br$ ;  $[N_{4444}]Cl$ ;  $[P_{4444}]Br$ ;  $[P_{4441}][MeSO_4]$  e  $[P_{(4444)_1}][Tos]$ ) e sais ( $K_3PO_4$ ;  $KH_2PO_4$  e  $K_2HPO_4$ ) para extrair o antidepressivo cloridrato de amitripitilina (AMI), concluiu-se que a partição ocorre para a fase superior (rica em líquidos iônicos) ( $\log K > 0$ ) com eficiências de extração muito altas, variando de 66 a 100%. O processo também demonstrou ser eficiente em relação à recuperação do antidepressivo, para as etapas de extração ( $92\% < EE < 100\%$ ) e isolamento ( $95\% < EE < 98,73\%$ ) (Zawadzki *et al.*, 2016).

## 7.3 CONCLUSÕES

Os sistemas aqui apresentados nas suas diferentes formas de apresentação: aquoso, aquoso micelar, bifásico e etanólico têm-se mostrado versáteis no tocante aos constituintes e versáteis em relação as suas aplicações. Neste capítulo realizou-se um pequeno recorte de aplicações dos sistemas bifásicos para separação, concentração e purificações de biomoléculas com potencial aplicação na indústria farmacêutica. Esses sistemas são em sua maioria biocompatíveis com as biomoléculas e possibilitam pouca ou nenhuma perda de atividade biológica. Acrescenta-se aos sistemas a sua facilidade de ampliação de escala e possibilidade de transitar por sistemas hidrofóbicos e hidrofílicos a depender da escolha dos constituintes. Portanto, o levantamento de dados de equilíbrio e experimentos de particionamento, concentração e purificação são úteis nas tomadas de decisão e escolha dos sistemas desejados.

# LEITURA COMPLEMENTAR



Os leitores interessados em maior aprofundamento podem consultar as seguintes obras de referência:

Grilo, A.L., Aires-Barros M.R., Azevedo, A.M. **Partitioning in aqueous two-phase systems: Fundamentals, Applications and Trends.** Separation & Purification Reviews. 45: 68-80, 2016.

Pereira, J.F., Freire, M.G., Coutinho, J.A.P. **Aqueous two-phase systems: Towards novel and more disruptive applications,** Fluid Phase Equilibria. 505: 112341, 2020.

Rito-Palomares, M. **Practical application of aqueous two-phase partitioning to process development for the recovery of biological products.** Journal of Chromatography B. 807: 3-11, 2004.

Asenjo, J.A., Andrews, B.A. **Aqueous two-phase systems for protein separation: Phase separation and applications,** Journal of Chromatography A. 1238: 1-10, 2012.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem aos diferentes órgãos de fomento acadêmico da CAPES, CNPq, BNB, FAPITEC e FAPESB pelo suporte financeiro aos trabalhos desenvolvidos, assim como as bolsas dos alunos Filipe S. Buarque, Kênia M. Souza, Paula G.C. Gomes e as bolsas de Produtividade 1C do docente Álvaro S. Lima e 2 do docente Ranyere L. Souza.

## REFERÊNCIAS

- Abbott, A.P., Capper, G., Davies, D. L., Rasheed, R.K., Tambyrajah, V. Novel solvent properties of choline chloride urea mixtures. *Chemical Communication*. 1: 70–71, 2003.
- Alberti, A., Zielinski, A.A.F., Couto, M., Judacewski, P., Mafra, L.I., Nogueira, A. Distribution of phenolic compounds and antioxidant capacity in apples tissues during ripening. *Journal of Food Science and Technology*. 5: 1-8, 2017.
- Alonso, R.G., Esponda, S.M., Ferrera, Z.S. Rodríguez, J.I.S. Liquid chromatography methodologies for the determination of steroid hormones in aquatic environmental systems. *Trends in Environmental Analytical Chemistry*. 3-4: 14-27, 2014.
- Alu'datt, M., Rababah, T., Alhamad, M.N., Almahasneh, M., Almajwal, A., Gammoh, S., Ereifej, K., Johargy, A., Alli, I. A review of phenolic compounds in oil-bearing plants: Distribution, identification and occurrence of phenolic compounds. *Food Chemistry*. 218: 99-106, 2017.
- Belmiro, T.M.C., Pereira, C.F., Paim, A.P.S. Red wines from South America: Content of phenolic compounds and chemometric distinction by origin. *Microchemical Journal*. 133: 114-120, 2017.
- Buarque, F.S.; Soares, C.M.F.; Souza, R.L.; Pereira, M.M.; Lima, A.S. Development of an ethanolic two-phase system (ETPS) based on polypropylene glycol 2000 + ethylene glycol + ethanol for separation of hydrophobic compounds. *Chemical Communications*. 57: 2156-2159, 2021.
- Caban, M., Lis, E., Kumirska, J., Stepnowski, P. Determination of pharmaceutical residues in drinking water in Poland using a new SPE-GC-MS(SIM) method based on Speedisk extraction disks and DIMETRIS derivatization. *Science of the Total Environment*. 538: 402-411, 2015.

Camêlo, L.C.A., Santos, G. S., Souza, R.L., Soares, C.M.F., Pereira, J.F.B., Lima, A.S. Protic ionic liquids as constituent of aqueous two-phase system based on acetonitrile: Synthesis, phase diagrams and genipin pre-purification. *Fluid Phase Equilibria*. 507: 1-11, 2020.

Cardoso, G.B., Mourão, T., Pereira, F.M., Fricks, A.T., Freire, M.G., Soares, C.M.F., Lima, A.S. Aqueous two-phase systems based on acetonitrile and carbohydrates and their application to the extraction of vanilin. *Separation and Purification Technology*. 104: 106-113, 2013.

Cardoso, G.B., Souza, I.N., Freire, M.G., Soares, C.M.F., Lima, A.S. Novel aqueous two-phase systems composed of acetonitrile and polyols: Phase diagrams and extractive performance. *Separation and Purification Technology*. 124: 54-60, 2014.

Cardoso, G.B., Souza, I.N., Pereira, M.M., Costa, L.P., Freire, M.G., Soares, C.M.F., Lima, A.S. Poly(vinyl alcohol) as a novel constituent to form aqueous two-phase systems with acetonitrile: Phase diagrams and partitioning experiments. *Chemical Engineering Research & Design*. 94: 317-323, 2015.

Chao, P.Y., Yong, L.Z., Li, L., Li, W.J., Yong, W.H. Selective separation of protein and saccharides by ionic liquids aqueous two-phase system. *Science China*. 53: 1554-1550, 2010.

Cláudio, A.F.M.; Marques, C.F.C.; Boal-Palheiros, I.; Freire, M.G.; Coutinho, J.A.P. Development of back-extraction and recyclability routes for ionic-liquid-based aqueous two-phase systems. *Green Chemistry*. 6, 259-268, 2014.

Cordisco, E., Haidar, C.N., Coscueta, E.R., Nerli, B.B., Malpiedi, L.P. Integrated extraction and purification of soy isoflavones by using aqueous micellar system. *Food Chemistry*. 213: 514-520, 2016.

Díaz-Quiroz, C., González, L., Álvarez, M.S., Hernández-Chávez, J.F., Rodríguez, A., Deive, F.J., Mercado, G.U. Biocompatible amino acid-

based ionic liquids for extracting hormones and antibiotics from swine effluents. *Separations and Purification Technology*. 250: 117068, 2020b.

Díaz-Quiroz, C., Hernández-Chávez, J.F., Mercado, G.U., Deive, F.J., Gortáres-Moroyoqui, P., Molina-Barrios, R.M. Simultaneous extraction of antibiotic and estrogen from animal blood serum using aqueous two-phase systems as predictor of environmental impact. *Environmental Science and Pollution Research*. 27: 28536-28544, 2020a.

Dinis, T.B.V., Passos, H., Lima, D.L.D., Esteves, V.I., Coutinho, J.A.P., Freire, M.G. One-step extraction and concentration of estrogens for an adequate monitoring of wastewaters using ionic-liquid-based aqueous biphasic system. *Green Chemistry*. 17: 2570-2579, 2015.

Freire, M.G., Cláudio, A.F.M., Araújo, J.M.M., Coutinho, J.A.P., Marrucho, I.M., Canongia, J.N., Rebelo, L.P.N. Aqueous biphasis system; a boost brought about by using ionic liquid. *Chemical Society Reviews*. 41: 4966-4995, 2012.

Giada, M.L.R. Food Phenolic Compounds: Main classes, sources and their antioxidant power. In: MORALES-GONZÁLEZ, A. *Oxidative stress and chronic degenerative diseases - A role for antioxidants*. Rijeka: Intech, p. 87–112, 2013.

Gomes, P.G.C., Veloso, A.F., Maynard, I.F.N., Marques, M.N., Souza, R. L., Pereira, M.M., Soares, C.M.F., Lima, A.S. Integrative process to extract chlorophyll and purify rosmarinic acid from rosemary leaves (*Rosmarinus officinalis*). *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 95: 1503-1510, 2020.

Grohman, C., Tintinger, R., Zhu, J., Maurer, G. Aqueous two-phase systems of poly(ethylene glycol) and dextran — experimental results and modeling of thermodynamic properties. 106: 111–138, 1995.

Guedes-Alonso, R., Esponda, S.M., Ferrera, Z.S., Rodríguez, J.J.S. *Liquid Chromatography methodologies for the determination of*

steroid hormones in aquatic environmental systems. *Trends in Environmental Analytical Chemistry*. 3: 14-27, 2014.

Gutowski, K.E., Brokerm G.A., Willauer, H.D., Husslston, J.G., Swatloski, R.P., Holbrey, J.D., Rogers, R.D. Controlling the aqueous miscibility of ionic liquid: Aqueous biphasic systems of water-miscible ionic liquids and water-structuring salts for recycle, metathesis, and separations. *Journal of the American Chemical Society*. 125: 6632-6633, 2003.

Hu, M., Zhai, Q., Liu, Z., Xia, S. Liquid-liquid and solid-liquid equilibrium of the ternary system ethanol + cesium sulfate + water at (10, 30, and 50)°C. *Journal of Chemical & Engineering Data*. 48: 1561-1564, 2003.

Jiang, Y., Xia, H., Guo, C., Mahmood, I., Liu, H. Phenomena and mechanism for separation and recovery of penicillin in ionic liquids aqueous solution. *Industrial & Engineering Chemistry Research*. 46: 6303-6312, 2007.

Jiang, Y., Xia, H., Yu, J., Guo, C., Liu, H. Hydrophobic ionic liquids-assisted polymer recovery during penicillin extraction in aqueous two-phase system. *Chemical Engineering Journal*. 147: 22-26, 2009.

Johansson, H.O., Karlström, G., Tjerneld, F., Haynes, C. A. Driving forces for phase separation and partitioning in aqueous two-phase systems. *Journal of Chromatography B*. 711: 3-17, 1998.

Kabir, E.R., Rahman, M.S., Rahman, I. A review on endocrine disruptors and their possible impacts on human health. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 40: 241-258, 2015.

Khan, F., Sheikh, M.S., Rub, M.A., Azum, N., Asiri, A.M. Antidepressant drug amitriptyline hydrochloride (AMT) interaction with anionic surfactant sodium dodecyl sulfate in aqueous/brine/urea solutions at different temperatures. *Journal of Molecular Liquids*. 222, 1020-1030, 2016.

Lee, C.K., Sandler, S.I. Vancomycin partitioning in aqueous two-phase systems: Effects of pH, salts, and an affinity ligand. *Biotechnology Bioengineering*. 35: 408–416, 1990.

Lei, X., Diamond, A.D., Hsu, J.T. Equilibrium phase behavior of the poly(ethylene glycol)/potassium phosphate/water two-phase system at 4 degree C. *Journal of Chemical & Engineering Data*. 35: 420–423, 1990.

Leite, A.C., Ferreira, A.M., Morais, E.S., Khan, I., Freire, M.G., Coutinho, J.A.P. Cloud point extraction of chlorophylls from spinach leaves using aqueous solutions of non-ionic surfactants. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*. 6: 590-599, 2018.

Lima, A.S., Oliveira, B.S., Shabudin, S.V., Almeida, M., Freire, M.G., Bica, K. Purification of anthocyanins from grape pomace by centrifugal partition chromatography. *Journal of Molecular Liquids*. 326: 115324, 2021.

Madeira, P.P., Teixeira, J.A., Macedo, E.A., Mikheecam L.M., Zaslavskym B.Y. Correlations between distribution coefficients of various biomolecules in different polymer/polymer aqueous two-phase systems. *Fluid Phase Equilibria*. 267: 150–157, 2008.

Merchuk, J.C., Andrews, B.A., Asenjo, J.A. Aqueous two-phase systems for protein separation: Studies on phase inversion. *Journal of Chromatography B*. 711: 285-293, 1998.

Molino, J.V.D., Marques, D.A.V., Pessoa-Júnior, A., Mazzola, P.G., Gatti, M.S.V. Different types of aqueous two-phase systems for biomolecule and bioparticle extraction and purification. *Bioseparation and Downstream Process*. 29: 1343-1353, 2013.

Oliveira, B.S., D'anzicourt, C.M.S., Souza, R. L., Soares, C.M.F., Lima, A.S. Liquid-liquid extraction of phenolic compounds in systems based on acetonitrile + water + polyvinylpyrrolidone at 298.15 K. *Separation and Purification Technology*. 211: 117-123, 2018.

Padilha, C.E.A., Azevedo, J.C.S., Junior, F.C.S., Junior, S.D.O., Souza, D.F.S., Oliveira, J.A., Macedo, G.R., Santos, E.S. Recovery of polyphenols from camu-camu (*Myrciaria dubia* H.B.K. McVaugh) depulping residue by cloud point extraction. *Chinese Journal of Chemical Engineering*. 26: 2471-2476, 2018.

Passos, H., Sousa, A.C.A., Pastorinho, M.R., Nogueira, A.J.A., Rebelo, L.P.N., Coutinho, J.A.P., Freire, M.G. Ionic-liquid-based aqueous biphasic system for improved detection of bisphenol A in human fluids. *Analytical Methods*. 4: 2664-2667, 2012.

Paz, M., Gúllon, P., Barroso, M.F., Carvalho, A.P., Domingues, V.F., Gomes, A.M., Delerue-Matos, C. Brazilian fruit pulps as functional foods and additives: Evaluation of bioactive compounds. *Food Chemistry*. 172: 462-468, 2015.

Plácido, N.S.O., Carlos, A.L.S., Galvão, J.U., Souza, R.L., Soares, C.M.F., Mattedi, S., Fricks, A.T., Lima, A.S. Protic ionic liquids as a constituent of biphasic systems based on acetonitrile: Phase diagram and alkaloid partitioning. *Separation and Purification Technology*. 200: 318-326, 2018.

Quinete, N., Bertram, J., Reska, M., Lang, J., Kraus, T. Highly selective and automated online SPE LC-MS<sup>3</sup> method for determination of cortisol and cortisone in human hair as biomarker for stress related diseases. *Talanta*. 134: 310-316, 2015.

Regupathi, I., Murugesan, S., Govindarajan, R., Amaresh, S.P., Thanapalan, M. Liquid-liquid equilibrium of poly(ethylene glycol) 6000 + triammonium citrate + watersystems at different temperatures. *Journal of Chemical & Engineering Data*. 54: 1094-1097, 2009.

Reis, I.A.O., Campos, A.F., Santos, P.H.S., Santos, S.B., Soares, C.M.F., Lima, A.S. Potassium phosphate salts-based aqueous two-phase systems applied in the extraction of gallic acid from guava. *Separation and Science Technology*. 50: 520-528, 2015.

Reis, I.A.O., Santos, S.B., Santos, L.A., Oliveira, N., Freire, M.G., Pereira, J.F.B., Ventura, S.P.M., Coutinho, J.A.P., Soares, C.M.F., Lima, A.S. Increased significance of food wastes: Selective recovery of added-value compounds. *Food Chemistry*. 135: 2453-2461, 2012.

Reis, I.A.O., Santos, S.B., Pereira, F.D.S., Sobral, C.R.S., Freire, M.G., Freitas, L.S., Soares, C.M.F., Lima, A.S. Extraction and recovery of rutin from acerola waste using alcohol-salt-based aqueous two-phase systems. *Separation Science and Technology*. 49: 656-663, 2014.

Reis, I.A.O., Santos, S.B., Pereira, J.F.B., Freire, M.G., Ventura, S.P.M., Coutinho, J.A.P., Soares, C.M.F., Lima, A.S. Increased significance of food wastes: Selective recovery of added-value compounds. *Food Chemistry*. 135: 2453-2461, 2012.

Robert, A., Schultz, I.R., Hucher, N., Monsinjon, T., Knigge, T. Toxicokinetics, disposition and metabolism of fluoxetine in crabs. *Chemosphere*. 186: 958-967, 2017.

Rosa, P.A., Azevedo, A.M., Sommerfeld, S., Backer, W., Aires-Barros, M.R. Aqueous two-phase extraction as a platform in the biomanufacturing industry: Economical and environmental sustainability. *Biotechnology Advances*. 29: 559-567, 2011.

Rosário, R.L.S.F., Souza, R.L., Farias, F.O., Mafra, M.R., Soares, C.M.F., Passos, H., Coutinho, J.A.P., Lima, A.S. Acetonitrile as adjuvants to tune polyethylene glycol + K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> aqueous two-phase systems and its effect on phenolic compounds partition. 223: 41-48, 2019

Rub, M.A., Alabbasi, A., Azum, N., Asiri, A.M. Aggregation and surface phenomena of amitriptyline hydrochloride and cationic benzethonium chloride surfactant mixture in different media. *Journal of Molecular Liquids*. 300: 112346, 2020.

Ruiz-Ruiz, F., Benavides, J., Rito-Palomares, M. Aqueous two-phase affinity partitioning systems: Current applications and trends. *Journal of Chromatography A*. 1244: 1-13, 2012.

Santos, J.H.P.M., Almeida, M.R., Martins, C.I.R., Dias, A.C.R.V., Freire, M.G., Coutinho, J.A.P., Ventura, S.P.M. Separation of phenolic compounds by centrifugal partition chromatography. *Green Chemistry*. 20: 1906-1916, 2018.

Santos, J.H.P.M., Ferreira, A.M., Almeida, M.R., Quinteiro, P.S.G.N., Dias, A.C.R.V., Coutinho, J.A.P., Freire, M.G., Rangel-Yagui, C.O., Ventura, S.P.M. Continuous separation of cytochrome-c PEGylated conjugates by fast centrifugal partition chromatography. *Green Chemistry*. 21: 5501-5506, 2019.

Santos, P.L., Santos, I.N.S., Ventura, S.P.M., Souza, R.L., Coutinho, J.A.P., Soares, C.M.F., Lima, A.S. Recovery of capsaicin from *Capsicum frutescens* by applying aqueous two-phase systems based on acetonitrile and cholinium-based ionic liquids. *Chemical Engineering Research & Design*. 112: 103-112, 2016.

Saravanan, S., Reena, J. A., Rao, J. R., Murugesan, T., Nair, B. U. Phase equilibrium compositions, densities, and viscosities of aqueous two-phase poly (ethylene glycol) + poly (acrylic acid) system at various temperatures. *Journal of Chemical & Engineering Data*. 51: 1246-1249, 2006.

Schultz, M.M., Furlong, E.T. Trace analysis of antidepressant pharmaceuticals and their select degradates in aquatic matrixes by LC/ESI/MS/MS. *Analytical Chemistry*. 80: 1756-1762, 2008.

Shin, J., Rhee, C., Shin, J., Min Jang, H., Gu Shin, S., Mo Kim, Y. Determining the composition of bacterial community and relative abundance of specific antibiotics resistance genes via thermophilic anaerobic digestion of sewage sludge. *Bioresource Technology*. 311: 123510, 2020.

Silva, C.P., Otero, M., Esteves, V. Processes for the elimination of estrogenic steroid hormones from water: A review. *Environmental Pollution*. 165: 38-58, 2012.

Singh, A., Gautam, P.K., Verma, A., Singh, V., Shivapriya, P.M., Shivalkar, S., Sahoo, A.K., Samanta, S.K. Green synthesis of metallic nanoparticles as effective alternatives to treat antibiotics resistant bacterial infections: A review. *Biotechnology Reports*. 25: e00427, 2020.

Soares, B.P., Santos, J.H.P.M., Martins, M., Almeida, M.R., Santos, N.V., Freire, M.G., Santis-Ebinuma, V.C., Coutinho, J.A.P., Pereira, J.F.B., Ventura, S.P.M. Purification of green fluorescent protein using fast centrifugal partition chromatography. *Separation and Purification Technology*. 257: 117648, 2021.

Soares, R.R., Azevedo, A.M., Van Alstine, J.M., Aires-Barros, M.R. Partitioning in aqueous two-phase systems: Analysis of strengths, weaknesses, opportunities and threats. *Biotechnology Journal*. 10: 1158-1169, 2015.

Sodré, F.F., Pescara, I.C., Montagner, C.C., Jardim, W.F. Assessing selected estrogens and xenoestrogens in Brazilian surface waters by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Microchemical Journal*. 96: 92-98, 2010.

Souza, I.N., Soares, C.M.F., Souza, R.L., Freire, M.G., Lima, A.S. Aqueous two-phase systems formed by maltodextrin and acetonitrile: Phase diagrams and partitioning studies. *Fluid Phase Equilibria*. 476: 179-185, 2018.

Souza, K.M., Maciel, G., Buarque, F.S., Santos, A.J., Marques, M.N., Cavalcanti, E.B., Soares, C.M.F., Lima, A.S. Novel phase diagrams of aqueous two-phase systems based on tetrahydrofuran + carbohydrates + water: Equilibrium data and partitioning experiments. *Fluid Phase Equilibria*. 433: 1-9, 2017.

Souza, K.M., Merlo, L., Marques, M.N., Cavalcanti, E.B., Souza, R.L., Soares, C.M.F., Lima, A.S. Partitioning of diuron in a novel aqueous two-phase system based on polyols and tetrahydrofuran. *Fluid Phase Equilibria*. 429: 325-330, 2016.

Souza, R.L., Lima, R.A., Coutinho, J.A.P., Soares, C.M.F., Lima, A.S. Aqueous two-phase systems based on cholinium salts and tetrahydrofuran and their use for lipase purification. *Separation and Purification Technology*. 155: 118-126, 2015.

Torres, F.A.E., Francisco, A.C.A., Pereira, J.F.B., Santos-Ebinuma, V.C. Imidazolium-based ionic liquid as co-surfactant in aqueous micellar two-phase systems composed of nonionic surfactant and their aptitude for recovery of natural colorants from fermented broth. *Separation and Purification Technology*. 196: 262-269, 2017.

Tubio, G., Nerli, B.B., Picó, G.A., Venâncio, A., Teixeira, J. Liquid-liquid equilibrium of the Ucon 50-HB5100/sodium citrate aqueous two-phase systems. *Separation and Purification Technology*. 65: 3-8, 2009.

Verbinnen, R.T., Nunes, G.S., Vieira, E.M. Determinação de hormônios estrógenos em água potável usando CLAE-DAD. *Química Nova*. 33: 1837-1842, 2010.

Vicente, F.A., Cardoso, I.S., Sintra, T.E., Lemus, J., Marques, E.F., Ventura, S.P.M., Coutinho, J.A.P. Impact of surface-active ionic liquids on the cloud points of nonionic surfactants and the formation of aqueous micellar two-phase systems. *The journal of physical chemistry B*. 121: 8742-8755, 2017.

Vichapong, J., Sookserm, M., Srijesdaruk, V., Swatsitang, P., Srijaranai, S. High performance liquid chromatographic analysis of phenolic compounds and their antioxidant activities in rice varieties. *LWT - Food Science Technology*. 43: 1325-1330, 2010.

Villanueva-Bermejo, D., Zahran, F., Troconis, D., Villalva, M., Reglero, G., Fornari, T. Selective precipitation of phenolic compounds from *Achillea millefolium* L. extracts by supercritical anti-solvent technique. *The Journal of Supercritical Fluids*. 120: 52-58, 2017.

Wang, R., Chang, Y., Tan, Z., Li, F. Applications of choline amino acid ionic liquid in extraction and separation of flavonoids and pectin from ponkan peels. *Separation and Science Technology*. 51: 1093-1102, 2016.

Wang, Y., Han, J., Xu, X., Hu, S., Yan, Y. Partition behavior and partition mechanism of antibiotics in ethanol/2-propanol-ammonium sulfate aqueous two-phase systems. *Separation and Purification Technology*. 75: 352-357, 2010.

Zawadzki, M., E Silva, F.A., Domańska, U., Coutinho, J.A.P., Ventura, S.P.M. Recovery of an antidepressant from pharmaceutical wastes using ionic liquid-based aqueous biphasic systems. *Green Chemistry*. 18: 3527-3536, 2016.

Zeng, Q., Wang, Y., Huang, Y., Ding, X., Chen, J., Xu, K. Deep eutectic solvents as novel extraction media for protein partitioning. *Analyst*. 139: 2565-2573, 2014.

# 8

## Sobre os autores

**Adalberto Pessoa Junior** – (e-mail: pessoajr@usp.br). Engenheiro de Alimentos (UFV), mestrado e doutorado em Tecnologia Bioquímica-farmacêutica (USP) com doutorado duplo (GBF, Alemanha) e estágio Pós-Doutoral no MIT (Estados Unidos). Professor Titular da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP. Professor Visitante no King's College London (UK).

**Álvaro Silva Lima** – (e-mail: alvaro\_lima@unit.br) Engenheiro Químico (UFS) com mestrado e doutorado em Engenharia de Alimentos (UNICAMP). Realizou estágio pós-doutoral na Universidade de Aveiro (Portugal) e Vienna University of Technology (Austria). Professor da Universidade Tiradentes e Pesquisador do Instituto de Tecnologia e Pesquisa. Pesquisador 1C do CNPq.

**Amaro Gomes Barreto Júnior** - (email: amaro@eq.ufrj.br). Engenheiro Químico (EQ/UFRJ) com mestrado e doutorado em Engenharia Química (PEQ/COPPE/UFRJ). Realizou estágio Pós-doutoral na Faculdade de Engenharia Química (UNICAMP). Professor na Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). Professor do corpo permanente do Programa de Engenharia de Processos Químicos e Bioquímicos (EPQB/EQ/UFRJ).

**Argimiro Resende Secchi** - (email: arge@peq.coppe.ufrj.br). Engenheiro Químico (UFRGS) com mestrado e doutorado em Engenharia Química (PEQ/COPPE/UFRJ). Professor Titular do Programa de Engenharia Química (PEQ) da COPPE/UFRJ. Atua nos Programas de Pós-graduação de Engenharia Química (PEQ/COPPE/UFRJ) e Engenharia de Processos Químicos e Bioquímicos (EPQB/EQ/UFRJ). Suas pesquisas estão na área de engenharia de sistemas em processos (PSE).

**Cesar Costapinto Santana** – (e-mail: cesarsantana@gmail.com) Químico Industrial (UFS) com mestrado e doutorado em Engenharia Química (COPPE/UFRJ). Realizou estágio pós-doutoral na North

Carolina State University (USA). Professor Sênior da Universidade Tiradentes, Pesquisador do Instituto de Tecnologia e Pesquisa. Professor Titular Colaborador na Unicamp. Pesquisador Sênior do CNPq.

**Felipe Coelho Cunha** - (email: fcoelho@peq.coppe.ufrj.br). Engenheiro Químico (EQ/UFRJ) com mestrado e doutorado em Engenharia Química (PEQ/COPPE/UFRJ). Realiza o pós-doutorado no Programa de Pós-graduação em Engenharia de Processos Químicos e Bioquímicos (EPQB/EQ/UFRJ). Suas experiências estão na área de separação em processos de engenharia química, como membrana e cromatografia contínua.

**Filipe Smith Buarque** - (e-mail: engfilipesmith@gmail.com) Engenheiro de Petróleo (UNIT). Mestre e doutor em Engenharia de Processos (UNIT) pela Universidade Tiradentes (UNIT).

**Francisco Vitor Santos da Silva** - (email: franciscovssilva@gmail.com). Engenheiro de Bioprocessos e Biotecnologista (UFPR) com doutorado em Engenharia Química (Otto-von-Guericke Universität Magdeburg, Alemanha). Realizou estágio Pós-doutoral na USP e na University College Cork (Irlanda). Cientista de Instrumentação na University of Limerick (Irlanda), leciona regularmente na USP e na University College Cork.

**Ivanildo José da Silva Junior** - (e-mail: ivanildo@gpsa.ufc.br). Engenheiro Químico (UFRN) possui mestrado e doutorado em Engenharia Química (UNICAMP). É professor Associado III da Universidade Federal do Ceará. Pesquisador 2-C do CNPq.

**João Henrique Picado Madalena Santos** - (e-mail: joaohenriqu22@gmail.com). Biotecnólogo com mestrado na Universidade de Aveiro (Portugal) e doutorado duplo entre Universidades de Aveiro e São Paulo. Realizou o estágio pós-doutoral na Faculdade de Ciências Farmacêuticas

da USP e no Instituto de Pesquisas Tecnológicas. Professor colaborador PART na FCF-USP e Cientista de Processos de Desenvolvimento e Inovação na Empresa uniQure (Holanda), líder em terapia gênica.

**Juliana Faccin De Conto Borges** - (e-mail: [juliana\\_faccin@itp.org.br](mailto:juliana_faccin@itp.org.br)) Engenheira de Alimentos (URI-Erechim) com mestrado e doutorado em Engenharia de Processos (UNIT-SE). Realizou doutorado sanduíche na Wayne State University (Detroit-MI USA). Pesquisadora do Instituto de Tecnologia e Pesquisa (ITP).

**Kênia Marcatti Souza** - (e-mail: [kmarcatti@gmail.com](mailto:kmarcatti@gmail.com)) Engenheira Ambiental (Unit) com mestrado e doutorado em Engenharia de Processos (UNIT-SE).

**Larissa Pereira Brumano** - (e-mail: [larissabrumano@gmail.com](mailto:larissabrumano@gmail.com)). Farmacêutica (UFJF), Doutorado em Biotecnologia Industrial (USP), com doutorado duplo no Leibniz Institute of Engineering and Bioeconomy (Alemanha). Pós-doutorado na Novo Nordisk Foundation Center for Biosustainability - Technical University of Denmark (Dinamarca).

**Maurício Bezerra de Souza Jr.** - (email: [mbsj@eq.ufrj.br](mailto:mbsj@eq.ufrj.br)). Engenheiro Químico (UFPE) com mestrado e doutorado em Engenharia Química (PEQ/COPPE/UFRJ). Professor Titular na Escola de Química (EQ) da UFRJ. Atua no Programa de Pós-graduação em Engenharia de Processos Químicos e Bioquímicos (EPQB/EQ/UFRJ) e colabora no Programa de Engenharia Química (PEQ/COPPE/UFRJ). Sua pesquisa é na área de modelagem, simulação e controle de processos.

**Paula Gabrielle Campos Gomes** - (e-mail: [paulacampos04@gmail.com](mailto:paulacampos04@gmail.com)) Engenheira de Petróleo (UNIT). Mestre em Engenharia de Processos pela Universidade Tiradentes (UNIT). Doutoranda em Engenharia Química pela Universidade Federal da Bahia (UFBA).

**Ranyere Lucena de Souza** - (e-mail: ranyere\_souza@itp.org.br) Engenheiro Ambiental (UNIT) com mestrado e doutorado em Engenharia de Processos (UNIT). Realizou doutorado sanduíche na Universidade de Aveiro (Portugal). Professor da Universidade Tiradentes e Pesquisador do Instituto de Tecnologia e Pesquisa. Bolsista 2 de Produtividade do CNPq.

**Silvia Maria Egues Dariva** - (e-mail: silvia\_egues@itp.org.br) Engenheira Química (UFS) com mestrado (UFSC) e doutorado (COPPE/UFRJ) em Engenharia Química. Realizou estágio pós-doutoral na Wayne State University de Detroit (Estados Unidos) e na University of British Columbia de Vancouver (Canadá). Professora da Universidade Tiradentes e Pesquisadora do Instituto de Tecnologia e Pesquisa. Pesquisadora DT2 do CNPq.

**Tamires Reis Menezes** - (e-mail: tamiresreismenezes@hotmail.com). Engenheira Química (UFS), com mestrado em Engenharia de Processos (UNIT), realizando atualmente doutorado em Engenharia de Processos (UNIT).

# PROCESSOS DE SEPARAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE PRODUTOS FARMACÊUTICOS

Por diversas razões o desenvolvimento da ciência e da tecnologia em biofármacos e fármacos sintéticos tem sido apontado como um aspecto dominante no século XXI em relação ao impacto no progresso social e econômico da humanidade. Esse desenvolvimento encontra diversos desafios e oportunidades a serem enfrentados nessa área do conhecimento visando os benefícios da biotecnologia aplicada especialmente na área dos cuidados com a saúde. Destacamos nesse campo de atividade as pesquisas e o projetos de processos na produção de antibióticos e antivirais, fármacos para o tratamento de doenças imunológicas, medicamentos para doenças cardiovasculares e fármacos para o sistema nervoso central, sistema gastrointestinal e tratamento do câncer além de analgésicos entre diversos outros.



**GRUPO  
TIRADENTES**  
*Inspirando o futuro*