



ALEX MARTINS RAMOS

**SEPARAÇÃO DE PIPERONAL CONTIDO EM UMA  
SOLUÇÃO DE SÍNTESE A PARTIR DO ÓLEO  
ESSENCIAL DE *Piper hispidinervum* C. DC POR  
CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA  
EFICIÊNCIA COM INJEÇÃO EMPILHADA**

Campinas - SP, dezembro de 2014





UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA

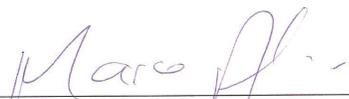
ALEX MARTINS RAMOS

**SEPARAÇÃO DE PIPERONAL CONTIDO EM UMA  
SOLUÇÃO DE SÍNTESE A PARTIR DO ÓLEO ESSENCIAL  
DE *Piper hispidinervum* C. DC POR CROMATOGRÁFIA  
LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA COM INJEÇÃO  
EMPILHADA**

Orientador: Prof. Dr. Marco Aurélio Cremasco

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Faculdade de Engenharia da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Doutor em Engenharia Química

**ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA  
TESE DEFENDIDA PELO ALUNO ALEX MARTINS RAMOS  
E ORIENTADA PELO PROF. DR. MARCO AURÉLIO  
CREMASCO**



---

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

Campinas- SP, dezembro de 2014

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

R147s Ramos, Alex Martins, 1981-  
Separação de piperonal contido em uma solução de síntese a partir do óleo essencial de *Piper hispidinervum* C. DC. por cromatografia líquida de alta eficiência com injeção empilhada. / Alex Martins Ramos. – Campinas, SP : [s.n.], 2014.

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

1. Piperonal. 2. Pimenta. 3. Cromatografia líquida de alta eficiência. 4. Fase reversa. 5. Adsorção. I. Cremasco, Marco Aurélio, 1962-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Química. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em outro idioma:** Separation of piperonal of synthetic solution from a *Piper hispidinervum* essential oil by high performance liquid chromatography with stacked injection

**Palavras-chave em inglês:**

Piperonal

Pepper

High performance liquid chromatography

Reversed phase

Adsorption

**Área de concentração:** Engenharia de Processos

**Titulação:** Doutor em Engenharia Química

**Banca examinadora:**

Marco Aurélio Cremasco [Orientador]

Luiz Gustavo Martins Vieira

Marlus Pinheiro Rolemberg

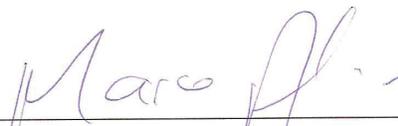
Ambrósio Florência de Almeida Neto

Guilherme José de Castilho

**Data de defesa:** 12-12-2014

**Programa de Pós-Graduação:** Engenharia Química

Tese de Doutorado defendida por Alex Martins Ramos e aprovada em 12 de dezembro de 2014 pela banca examinadora constituída pelos doutores:



---

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



---

Prof. Dr. Luiz Gustavo Martins Vieira  
Faculdade de Engenharia Química – UFU



---

Prof. Dr. Marlus Pinheiro Rolemberg  
Instituto de Ciência e Tecnologia – UNIFAL



---

Prof. Dr. Ambrósio Florêncio de Almeida Neto  
Faculdade de Engenharia Química – UNICAMP

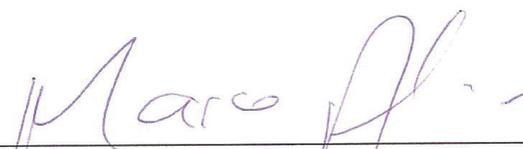


---

Prof. Dr. Guilherme José de Castilho  
Faculdade de Engenharia Química – UNICAMP



Este exemplar corresponde à versão final da Tese de Doutorado em Engenharia Química defendida por Alex Martins Ramos e aprovada em 12 de dezembro de 2014.

A handwritten signature in purple ink, reading "Marco Aurélio Cremasco". The signature is written in a cursive style with a horizontal line underneath it.

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

Dedico este trabalho...

À minha esposa Joelma Ramos, pela paciência e amor.

Aos meus pais Laurindo Ramos Filho e Gessy Martins Ramos pelo apoio, palavras de incentivo e fé.

Aos meus irmãos Arleson, Alaécio e Anaiza que mesmo distante estão presentes em meu coração.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, em primeiro lugar, pelo dom da vida, pelo seu amor incondicional e por me proporcionar saúde, serenidade e paz. Obrigado, Senhor, por me fazer crescer em fé nos momentos de dificuldade.

Ao professor Marco Aurélio Cremasco pela constante orientação, companheirismo e palavras de incentivo.

Aos professores Paulo de Tarso Vieira e Rosa e Isabel Cristina Sales Fontes Jardim, do Instituto de Química (UNICAMP) pela disposição e dicas em Cromatografia Líquida.

Ao professor Antônio Carlos Luz Lisboa pela disposição e pelos diálogos sobre a Educação em Engenharia Química.

Aos funcionários da Faculdade de Engenharia Química da UNICAMP que, de alguma forma, contribuíram para a execução e conclusão da minha tese. Em especial à Rosângela e Fabiane, por se mostrarem solícitas em todos os momentos.

À minha esposa Joelma Albuquerque pela paciência, carinho e amor, e por me ajudar nos momentos difíceis.

Aos meus pais Laurindo Ramos e Gessy Ramos, pelo apoio e compreensão.

Aos amigos Jean Vinicius, Wilson Murilo, Carlos Oliveira e Ana Carolina Nascimento, do Laboratório de Separações. Parte do trabalho só foi possível mediante as longas discussões sobre os eventuais problemas experimentais que surgiam.

Aos Amigos Ivanei Pinheiro, Bruno Cunha e Vicente Franco. Juntos, começamos essa caminhada chamada pós-graduação na UNICAMP, vindos do Amazonas.

Aos amigos Absolon Carvalho, Lucas Bessa, Fabiano Contesini, Leandro Oliveira, Ricardo Mateus e Roberta Belaz pelas conversas descontraídas, pela convivência harmoniosa e pela experiência de vida.

Aos amigos da Igreja de Barão Geraldo. Obrigado pelo companheirismo nessa caminhada de fé e comunhão.

Ao amigo Rhelvis Oliveira pelo fornecimento de água Milli Q. Sem sua ajuda, esta tese seria muito mais difícil.

Aos colegas do Grupo de Síntese Orgânica e CLAE, do Departamento de Química (UFSCAR) pela ajuda com os empacotamentos de coluna.

Aos professores Arvind Rajendran, da Unversidade de Alberta e Krzysztof Kaczmarek, da Universidade de Tecnologia de Rzeszów, pelas rotinas computacionais.

À Universidade Federal do Amazonas por me liberar das atividades para que pudesse exercer a pesquisa em tempo integral e pelo apoio financeiro.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM) e à Universidade do Estado do Amazonas pelo apoio financeiro e estrutura.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, mas que por algum motivo não foram mencionados, o meu muito obrigado.

E vi debaixo do sol, que não é dos ligeiros, a carreira; nem dos fortes, a batalha; nem dos sábios, o pão; nem dos prudentes, a riqueza; nem dos entendidos, o favor; mas o tempo e a oportunidade ocorrem a todos (Ec. 9:11).



## RESUMO

O piperonal é uma molécula de grande valor econômico, pois é utilizado como matéria-prima nas indústrias de cosméticos e de fármacos. Uma das formas de obtenção do piperonal é por meio de síntese cujo substrato é o safrol. O safrol é o principal constituinte químico do óleo essencial de pimenta-longa (*Piper hispidinervum*, C. DC), espécie que é abundante na região Amazônica. Após os processos de síntese aplicados diretamente no óleo de pimenta longa, obtém-se o piperonal, como produto principal, e os coprodutos safrol, *cis*-isosafrol, *trans*-isosafrol e terpinoleno. O rendimento dessa rota sintética é cerca de 84% de piperonal. Por este motivo, e considerando o alto valor agregado ao piperonal é que se propôs separá-lo por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com injeção empilhada. Nesse tipo de separação são essenciais as definições de tempo de ciclo e tempo de coleta. Para isso, foram empregadas duas abordagens: a abordagem experimental, na qual o tempo de ciclo e o tempo de coleta foram obtidos diretamente do cromatograma e a abordagem teórica que surgiu em decorrência do modelo proposto nesta Tese, onde os tempos de ciclo e coleta foram obtidos a partir dos parâmetros da curva gaussiana. Para essa última abordagem, são necessárias as constantes de equilíbrio e os parâmetros de transferência de massa ( $D_p$ ,  $D_{ef}$ ,  $D_s$  e  $E_b$ ), que foram obtidos experimentalmente. Foram empregados três sistemas cromatográficos de separação: o primeiro e segundo foi constituído de fase móvel acetonitrila/água – 70/30 (v/v) a 25 e 35°C e o terceiro, de fase móvel etanol/água – 70/30 (v/v) a 35°C, com detecção em 245 nm para todos os sistemas. Utilizou-se coluna analítica de 25 x 0,46 cm e coluna semipreparativa de 25 x 1,0 cm recheadas com fase estacionária  $C_{18}$  cujo tamanho médio de partícula foi 20  $\mu\text{m}$ . Na coluna analítica foram determinadas a porosidade total e as constantes de equilíbrio do piperonal, safrol, isosafrol e terpinoleno, nas vazões de 0,6 – 1,4  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ . Na coluna semipreparativa foram determinadas a porosidade total bem como os parâmetros de transferência de massa, nas vazões de 4,0 – 6,0  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ . Para realização da abordagem teórica, foi preparado uma solução na qual a concentração foi de 0,2  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ . Já na abordagem experimental, preparou-se uma solução de 9,50  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ . Os resultados quanto aos parâmetros cromatográficos e às constantes de equilíbrio mostraram que os componentes têm a seguinte ordem crescente de eluição: piperonal, safrol, isosafrol e terpinoleno. O piperonal tem a menor afinidade com a fase estacionária  $C_{18}$  enquanto o terpinoleno possui a maior. Quanto aos parâmetros de

transferência de massa, todos os valores foram próximos àqueles previsto na literatura, sendo o coeficiente de difusão efetivo da ordem de  $10^{-6} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$  e o coeficiente de dispersão axial da ordem de  $10^{-3} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ . Em relação à abordagem experimental, o piperonal apresentou pureza e recuperação superiores a 98% e 97%, em que a fase móvel acetonitrila/água à 25°C, constitui-se como o melhor sistema de separação. O mesmo resultado foi obtido para a abordagem teórica quanto ao sistema de separação, sendo a pureza e recuperação de aproximadamente 100% de piperonal. A CLAE semipreparativa com injeção empilhada mostrou-se bastante eficiente em termos de produção de piperonal com elevado grau de pureza. Os resultados indicaram também que uma quantidade maior de amostra pode ser injetada e as informações operacionais bem como os parâmetros determinados neste estudo podem ser facilmente implementados em cromatografia preparativa, tanto em batelada quanto contínua, para obter grandes quantidades de piperonal puro.

**Palavras-Chave:** pimenta longa, piperonal, mistura multicomponente, injeção empilhada, fase reversa.

## ABSTRACT

Piperonal is a molecule of great economic value because it is used as raw material in the cosmetic and pharmaceutical industries. One way of obtaining piperonal is through synthesis which substrate is safrole. Safrole is main constituents of the essential oil of long pepper (*Piper hispidinervum*, C. DC), specie that is abundant in Amazon region. After synthesis processes applied directly to the long pepper oil, piperonal is obtained as the main product and coproducts safrole, cis-isosafrole, trans-isosafrole and terpenolene. The throughput for this synthetic route is about 84% of piperonal. For this reason, and considering the high added value at the piperonal is proposed that separate it by High Performance Liquid Chromatography with stacked injection. For this, two approaches were used: the experimental approach, in which the cycle time and the time of collection were obtained directly from the chromatogram in concentrated solution and the theoretical approach that arose due to proposed model in the thesis on condition of infinite dilution, where cycle times and collection were obtained from the parameters of the Gaussian curve. In this last approach, the equilibrium constants and parameters of mass transfer ( $D_p$ ,  $D_{ef}$ ,  $D_s$  and  $E_b$ ), which were obtained experimentally are needed. Three chromatographic separation systems were used: the first and second, consisted of mobile phase acetonitrile/water – 70/30(v/v) at 25 and 35°C and the third, ethanol/water – 70/30 (v/v) at 35°C, with detection in 245 nm all systems. It was used analytical column of 25 x 0,45 cm and semipreparative column of 25 x 1,0 filled with stationary phase  $C_{18}$  which size particle is 20  $\mu\text{m}$ . In analytical column were determined the total porosity and equilibrium constants of piperonal, safrole, isosafrole and, terpinoleno, in flow rate of 0.6 – 1.4  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ . In semipreparative column were determined the total porosity as well as the parameters of mass transfer, in flow rates 4.0 – 6.0  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ . For the performance of theoretical approach, was prepared a solution in which the concentration 9.50  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ . The results regarding to chromatographic parameters and equilibrium constants showed that the components has a followed ascending order of elution: piperonal, safrole, isosafrole, terpinolene. The piperonal has a lowest affinity in respect to stationary phase  $C_{18}$  while terpinoleno has the greatest. Regarding mass transfer parameters, all values are close to those predicted in the literature, the effective diffusion coefficient of about  $10^{-6} \text{ cm}^2\cdot\text{s}^{-1}$  and the axial dispersion coefficient of the order of  $10^{-3} \text{ cm}^2\cdot\text{s}^{-1}$ . With respect to experimental

approach, piperonal presented purity and recovery greater than 98% and 97% in which mobile phase acetonitrile/water at 25°C, was established as the best separation system. The same result was obtained to theoretical approach regarding to separation system, being purity and recovery about 100% of piperonal. The semipreparative HPLC with stacked injection proved to be very efficient in terms of producing piperonal with high purity. The results also indicate that a greater amount of sample may be injected, and the operational information's and the parameters determined in this study may be easily implemented in preparative chromatography, either batch or continuous, to obtain large quantities of pure piperonal.

**Key-words:** long pepper, piperonal, multicomponent mixture, stacked injection, reversed phase.



# ÍNDICE

<b>RESUMO.....</b>	<b>xiii</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>xv</b>
<b>NOMENCLATURA .....</b>	<b>xxii</b>
<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>xxv</b>
<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>xxxii</b>
<b>CAPÍTULO 1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
1.2. Objetivo Geral.....	2
1.3. Objetivos Específicos .....	2
<b>CAPÍTULO 2. REVISÃO DA LITERATURA .....</b>	<b>3</b>
2.1. O piperonal e suas propriedades .....	3
2.1.1. Importância industrial .....	4
2.1.2. Obtenção .....	5
2.2. Fase estacionária – octadecilsilano (C <sub>18</sub> ).....	5
2.3. Leito fixo.....	6
2.3.1. Queda de pressão.....	7
2.4. Modelos de isoterma de adsorção .....	8
2.4.1. Modelo linear .....	8

2.4.2. Modelo Langmuir.....	8
2.4.3. Modelo de Langmuir modificado .....	9
2.4.4. Modelo de bi-Langmuir.. .....	9
2.5. Método de obtenção de isoterma .....	10
2.5.1. Tempo de retenção binário.....	10
2.6. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	11
2.6.1. Parâmetros cromatográficos.....	11
2.7. Separação cromatográfica por eluição.....	13
2.8. Separação cromatográfica com injeção empilhada.....	15
2.8.1. A técnica de injeção empilhada.....	15
2.8.2. Processo de separação cromatográfica com injeção empilhada.....	16
2.9. Proposição de modelo para separação cromatográfica empilhada .....	20
2.10. Obtenção experimental dos momentos da curva cromatográfica .....	25
2.11. Obtenção experimental de porosidades e constantes de equilíbrio termodinâmico ... .....	27
2.12. Parâmetros de desempenho.....	29
<b>CAPÍTULO 3. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>31</b>
3.1. Materiais e equipamentos .....	31
3.2. Reagentes .....	32
3.3. Métodos .....	33

3.3.1. Empacotamento da coluna.....	33
3.3.2. Determinação de comprimento de onda e verificação de empacotamento.....	34
3.3.3. Obtenção dos parâmetros cromatográficos.....	35
3.3.4. Determinação da porosidade total.....	35
3.3.5. Determinação de isoterma linear.....	35
3.3.6. Determinação de isoterma não linear.....	35
3.3.7. Determinação dos parâmetros de transferência de massa e queda de pressão...	36
3.4. Preparo da solução de trabalho .....	37
3.4.1. Separação em escala analítica .....	38
3.4.2. Separação em escala semipreparativa .....	38
3.4.3. Procedimentos com injeção empilhada: abordagem experimental .....	39
3.4.4. Procedimentos com injeção empilhada: abordagem teórica .....	40
3.4.5. Curva de calibração.....	41
<b>CAPÍTULO 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>44</b>
4.1. Caracterização do sistema cromatográfico analítico .....	44
4.2. Caracterização do leito.....	47
4.2.1. Determinação da porosidade total.....	47
4.2.2. Queda de pressão.....	48
4.3. Determinação de isoterma .....	49

4.3.1. Isoterma linear.....	49
4.3.2. Isoterma de Langmuir .....	53
4.4. Determinação dos coeficientes de dispersão axial e de transferência de massa .....	57
4.5. Separação cromatográfica por injeção empilhada: abordagem experimental.....	63
4.5.1. Separação de piperonal em escala semipreparativa .....	65
4.6. Separação cromatográfica por injeção empilhada: abordagem teórica.....	70
<b>CAPÍTULO 5. CONCLUSÃO .....</b>	<b>75</b>
<b>5.1. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS .....</b>	<b>77</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>78</b>
<b>APÊNDICE A .....</b>	<b>92</b>
<b>APÊNDICE B.....</b>	<b>95</b>
<b>ANEXO A.....</b>	<b>100</b>

## Nomenclatura

### Letras Latinas

$A_t$	- área da seção transversal da coluna	$M^2$
$C$	- concentração do soluto na fase móvel	$ML^{-3}$
$c_p$	- concentração do soluto na fase móvel intrapartícula	$ML^{-3}$
$c_{pt}$	- concentração do componente no platô intermediário	$ML^{-3}$
$c_0$	- concentração de injeção na coluna	$ML^{-3}$
$D_L$	- diâmetro da coluna de leito fixo	L
$d_p$	- diâmetro da partícula	L
$d_{po}$	- diâmetro do poro	L
$D_{AB}$	- coeficiente de difusão livre	$L^2T^{-1}$
$D_p$	- coeficiente de difusão nos poros	$L^2T^{-1}$
$D_{ef}$	- coeficiente efetivo de difusão	$L^2T^{-1}$
$D_s$	- coeficiente de difusão superficial	$L^2T^{-1}$
$E_b$	- coeficiente de dispersão axial	$L^2T^{-1}$
$k_m$	- coeficiente de transferência de massa global	$LT^{-1}$
$k_f$	- coeficiente de transferência de massa no filme	$LT^{-1}$
$k_p$	- constante de equilíbrio de partição	-
$L$	- altura do leito	L
$M$	- massa molar	$g \cdot mol^{-1}$
$M_n$	- massa molar numérica média	$g \cdot mol^{-1}$
$M_w$	- massa molar média ponderal	$g \cdot mol^{-1}$
$N$	- número de pratos teóricos	-
$P_{vap}$	- pressão de vapor	$ML^{-1}T^{-2}$
$Q$	- vazão volumétrica	$L^3T^{-1}$
$q$	- concentração do soluto na fase sólida	$ML^{-3}$
$R_s$	- resolução de uma banda cromatográfica	-
$t_0$	- tempo morto	T

$t_p$	- tempo de troca	T
$t_R$	- tempo de retenção do soluto	T
$t_c$	- tempo de ciclo	T
$t_{co}$	- tempo de coleta	T
$u_0$	- velocidade superficial	$LT^{-1}$
U	- velocidade intersticial	$LT^{-1}$
$V_{ads}$	- volume da fase estacionária	$L^3$
$V_F$	- volume de retenção no ponto de inflexão	$L^3$
$V_L$	- volume do leito	$L^3$
$V_0$	- volume morto	$L^3$
Y	- recuperação	-
W	- largura da banda cromatográfica	-

### Letras Gregas

$\alpha$	- fator de separação	-
E	- porosidade do leito de partícula	-
$\varepsilon_p$	- porosidade da partícula	-
$\varepsilon_t$	- porosidade total do leito	-
$\alpha$	- fator de separação	-
$\mu$	- primeiro momento da curva cromatográfica	T
$\rho$	- massa específica	$ML^{-3}$
$\lambda$	- parâmetro da isoterma de Langmuir modificada	-
$\eta$	- viscosidade dinâmica da fase móvel	$ML^{-1}T^{-1}$
$\phi$	- parâmetro da equação de Kozeny-Carmam	-
$\nu$	- viscosidade cinemática	$L^2T^{-1}$
$\psi$	- razão da porosidade do leito	-
$-\Delta P$	- queda de pressão	$ML^{-1}T^{-2}$
$\kappa$	- fator de retenção	-

$\sigma$  - segundo momento -

### Sobrescritos e subscritos

I - soluto considerado -

P - partícula -

### Abreviações

CFS	Cromatografia em fluido supercrítico
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
L-DOPA	L-3,4-dihydroxyphenylalanine
FDA	Food and Drug Administration
FE	Fase estacionária
FM	Fase móvel
HETP	Height equivalente theoretical plate
HETP <sub>mod</sub>	Modified height equivalente theoretical plate
HPLC	High performance liquid chromatography
PTFE	Polytetraflourethylene
RPLC	Reversed phase liquid chromatogrphy
UV-Vis	Ultravioleta- visível

## Lista de Figuras

	Pg.
<b>Figura 2.1 -</b> Fórmula estrutural do piperonal.	3
<b>Figura 2.2 -</b> Substâncias sintetizadas a partir do piperonal (SANTOS <i>et al.</i> 2004).	4
<b>Figura 2.3 -</b> Leito Fixo (adaptado de BRAGA, 2007).	7
<b>Figura 2.4 -</b> Cromatograma esquemático.	11
<b>Figura 2.5 -</b> Separação de mistura binária por eluição cromatográfica (SKOOG <i>et al.</i> , 2006).	14
<b>Figura 2.6 -</b> Representação de separação por injeção empilhada.	17
<b>Figura 2.7 -</b> Representação de uma gaussiana.	18
<b>Figura 2.8 -</b> Ilustração dos parâmetros da curva gaussiana	18
<b>Figura 2.9 -</b> Ilustração de um ciclo de resolução empilhada para n componentes.	20
<b>Figura 2.10 -</b> Comportamento dos parâmetros de desempenho (adaptado de Huber e Majors, 2007).	30
<b>Figura 3.1 -</b> Sistema Cromatográfico (adaptado de FERRARI, 2014).	32

- Figura 3.2 -** Obtenção do tempo de ciclo ( $t_c$ ) e do tempo de coleta ( $t_{co}$ ). 39  
 (1) piperonal; (2) safrol. Condições experimentais.  $Q = 3,00 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ;  $V_{\text{injeção}} = 800 \text{ }\mu\text{L}$ ;  $C = 10,0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  (85% de piperonal + 10% de safrol); Coluna = 25 x 1,0 cm.
- Figura 3.3 -** Obtenção do tempo de ciclo ( $t_c$ ) e do tempo de coleta ( $t_{co}$ ). 40  
 (1) piperonal; (2) safrol e isosafrol; (3) terpinoleno. Condições experimentais.  $Q = 5,00 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ;  $V_{\text{injeção}} = 800 \text{ }\mu\text{L}$ ;  $C = 10,0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  (85% de piperonal + 1,70% de safrol + 7,58% isosafrol + 0,90% de terpinoleno); Coluna = 25 x 1,0 cm.
- Figura 3.4 -** Curva de calibração em acetonitrila/água a 25°C: (a) piperonal; 42  
 (b) safrol; (c) isosafrol e (d) terpinoleno.
- Figura 3.5 -** Curva de calibração em acetonitrila/água a 25°C: (a) piperonal; 42  
 (b) safrol; (c) isosafrol e (d) terpinoleno.
- Figura 3.6 -** Curva de calibração em etanol/água a 35°C: (a) piperonal; (b) 43  
 safrol; (c) isosafrol e (d) terpinoleno.
- Figura 4.1 -** Cromatograma da mistura multicomponente a 25°C contendo (1) 45  
 piperonal, (2) safrol e isosafrol, (3) terpinoleno cuja concentração foi de  $0,60 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  na proporção porcentual de 85% de piperonal, 1,70% de safrol, 7,58 % isosafrol e 0,90 % de terpinoleno e volume de injeção de 20  $\mu\text{L}$ .
- Figura 4.3 -** Queda de pressão: fase móvel acetonitrila/água a (○) 25°C e 48  
 (■) 35°C e fase móvel etanol/água a (▲) 35°C.

- Figura 4.4 -** Constantes de equilíbrio: ( $\Delta$ ) terpinoleno, ( $\bullet$ ) isosafrol, ( $\square$ ) safrol, ( $\blacklozenge$ ) piperonal. Condições experimentais:  $Q = 0,6 - 1,4 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ; Temperatura =  $25^\circ\text{C}$ ; Fase móvel = acetonitrila/água. 50
- Figura 4.5 -** Constantes de equilíbrio: ( $\Delta$ ) terpinoleno, ( $\bullet$ ) isosafrol, ( $\square$ ) safrol, ( $\blacklozenge$ ) piperonal. Condições experimentais:  $Q = 0,6 - 1,4 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ; Temperatura =  $35^\circ\text{C}$ ; Fase móvel = acetonitrila/água. 51
- Figura 4.6 -** Constantes de equilíbrio: ( $\Delta$ ) terpinoleno, ( $\bullet$ ) isosafrol, ( $\square$ ) safrol, ( $\blacklozenge$ ) piperonal. Condições experimentais:  $Q = 0,6 - 1,4 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ; Temperatura =  $35^\circ\text{C}$ ; Fase móvel = etanol/água. 52
- Figura 4.7 -** Isotermas de Langmuir para mistura binária ( $\blacklozenge$ ) piperonal e ( $\square$ ) safrol em fase estacionária  $C_{18}$ .  $Q = 1,0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ; Temperatura =  $25^\circ\text{C}$ ; Detecção UV = 250 nm; Fase móvel = acetonitrila/água – 70/30(v/v). 54
- Figura 4.8 -** Isoterma de Langmuir para mistura binária ( $\blacklozenge$ ) piperonal e ( $\square$ ) safrol em fase estacionária  $C_{18}$ .  $Q = 1,0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ; Temperatura =  $35^\circ\text{C}$ ; Detecção UV = 250 nm; Fase móvel = acetonitrila/água – 70/30(v/v). 55
- Figura 4.9 -** Isoterma de Langmuir para mistura binária ( $\blacklozenge$ ) piperonal e ( $\square$ ) safrol em fase estacionária  $C_{18}$ .  $Q = 1,0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ; Temperatura =  $35^\circ\text{C}$ ; Detecção UV = 250 nm; Fase móvel = etanol/água – 70/30 (v/v). 56

- Figura 4.10** - Obtenção dos parâmetros de transferência de massa: 57  
 (●) isosafrol, (□) safrol (◆) piperonal, (Δ) terpinoleno. Condições experimentais:  $Q = 4,0 - 6,0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ; Fase móvel = acetonitrila/água; Temperatura =  $25^{\circ}\text{C}$ ; Coluna =  $25 \times 1,0 \text{ cm}$ .
- Figura 4.11** - Obtenção dos parâmetros de transferência de massa: 58  
 (●) isosafrol, (□) safrol (◆) piperonal, (Δ) terpinoleno. Condições experimentais:  $Q = 4,0 - 6,0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ; Fase móvel = acetonitrila/água; Temperatura =  $35^{\circ}\text{C}$ ; Coluna =  $25 \times 1,0 \text{ cm}$ .
- Figura 4.12** - Obtenção dos parâmetros de transferência de massa: 59  
 (●) isosafrol, (□) safrol (◆) piperonal, (Δ) terpinoleno. Condições experimentais:  $Q = 4,0 - 6,0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ; Fase móvel = etanol/água; Temperatura =  $35^{\circ}\text{C}$ ; Coluan =  $25 \times 1,0 \text{ cm}$ .
- Figura 4.13** - Cromatograma da mistura pseudo-binária piperonal(1)/safrol(2): 63  
 $Q = 1,0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ; Temperatura =  $35^{\circ}\text{C}$ ; Pressão =  $84 \text{ kgf}\cdot\text{cm}^{-2}$ ;  $V_{\text{injeção}} = 50 \text{ }\mu\text{L}$ ; Detecção UV =  $245 \text{ nm}$ ; Coluna =  $25 \times 0,46 \text{ cm}$ ;  $C = 1,00 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  (85% de piperonal + 10% de safrol).
- Figura 4.14** - Aumento da concentração. Condições experimentais: 64  
 $Q = 3,0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ; Temperatura =  $35^{\circ}\text{C}$ ; Pressão =  $33 \text{ kgf}\cdot\text{cm}^{-2}$ ;  $V_{\text{injeção}} = 800 \text{ }\mu\text{L}$ ; Detecção UV =  $260 \text{ nm}$ ; coluna =  $25 \times 1,0 \text{ cm}$ .
- Figura 4.15** - Cromatograma de cinco (a) e dez (b) injeções empilhadas: 66  
 (1) piperonal, (2) safrol/isosafrol, (3) terpinoleno.  $Q = 5,0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ; Temperatura =  $25^{\circ}\text{C}$ ; Pressão =  $25 \text{ kgf}\cdot\text{cm}^{-2}$ ;  $V_{\text{injeção}} = 800 \text{ }\mu\text{L}$ ; coluna =  $25 \times 1,0 \text{ cm}$ ; Fase móvel: acetonitrila/água - 70/30 (v/v);  $C = 10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  (85% de piperonal + 1,70% de safrol + 7,58% de isosafrol + 0,90% de terpinoleno).

- Figura 4.16 -** Cromatograma de cinco (a) e dez (b) injeções empilhadas: 67  
 (1) piperonal, (2) safrol/isosafrol, (3) terpinoleno.  $Q = 5,0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ; Temperatura =  $35^\circ\text{C}$ ; Pressão =  $25 \text{ kgf}\cdot\text{cm}^{-2}$ ;  $V_{\text{injeção}} = 800 \text{ }\mu\text{L}$ ; Coluna =  $25 \times 1,0 \text{ cm}$ ; Detecção UV =  $245 \text{ nm}$ ; Fase móvel: acetonitrila/água - 70/30 (v/v);  $C = 10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  (85% de piperonal + 1,70% de safrol + 7,58% de isosafrol + 0,90% de terpinoleno).
- Figura 4.17 -** Cromatograma referente a dez injeções empilhadas: 68  
 (1) piperonal, (2) safrol/isosafrol, (3) terpinoleno.  $Q = 5,0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ; Temperatura =  $35^\circ\text{C}$ ; Pressão =  $70 \text{ kgf}\cdot\text{cm}^{-2}$ ;  $V_{\text{injeção}} = 800 \text{ }\mu\text{L}$ ; Detecção UV =  $245 \text{ nm}$ ; Coluna =  $25 \times 1,0 \text{ cm}$ ; Fase móvel: etanol/água – 70/30 (v/v);  $C = 10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  (85% de piperonal + 1,70% de safrol + 7,58% de isosafrol + 0,90% de terpinoleno).
- Figura 4.18 -** Separação por injeção empilhada. Condições experimentais:  $Q = 5,0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ; Fase móvel = acetonitrila/água;  $C = 0,2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  (85% de piperonal + 1,70% de safrol + 7,58% de isosafrol + 0,90% de terpinoleno). Temperatura (a)  $25^\circ\text{C}$  e (b)  $35^\circ\text{C}$  72
- Figura 4.19 -** Separação por injeção empilhada. Condições experimentais: 73  
 $Q = 5,0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ; Fase móvel = etanol/água; Temperatura =  $35^\circ\text{C}$ ;  $C = 0,2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  (85% de piperonal + 1,70% de safrol + 7,58% de isosafrol + 0,90% de terpinoleno).
- Figura 20** Espectro de absorvância de (a) piperonal, (b) safrol, (c) isosafrol e 94  
 (d) terpinoleno. Condições experimentais:  $Q = 0,2 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ; Fase móvel: acetonitrila/água; Temperatura =  $25^\circ\text{C}$ ;  $V_{\text{injeção}} = 20 \text{ }\mu\text{L}$ ;  $C = 0,10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ; Faixa de varredura =  $190 - 370 \text{ nm}$ ; Passo de

varredura = 1,0 nm.

- Figura 21** Cromatograma da mistura (1) piperonal e (2) safrol. (a) 96  
Condições experimentais:  $Q = 1,0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ; Fase móvel:  
acetonitrila/água; Coluna: 25 x 1,0 cm;  $V_{\text{injeção}} = 20 \text{ }\mu\text{L}$ ;  
Proporção: 50% de piperonal/50% de safrol; Temperatura =  
25°C. (b) Derivada primeira referente aos dados experimentais:  
 $B = 2,0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ;  $C = 10,0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ;  $D = 15,0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ;  $E = 20,0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ .
- Figura 22** Cromatograma referente à mistura de (1) piperonal e (2) safrol. 97  
(a) Condições experimentais:  $Q = 1,0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ; Fase móvel:  
acetonitrila/água; Coluna: 25 x 1,0 cm;  $V_{\text{injeção}} = 20 \text{ }\mu\text{L}$ ;  
Proporção: 50% de piperonal/50% de safrol; Temperatura =  
35°C. (b) Derivada primeira referente aos dados experimentais:  
 $B = 2,0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ;  $C = 10,0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ;  $D = 15,0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ;  $E = 20,0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ .
- Figura 23** Cromatograma referente à mistura de (1) piperonal e (2) safrol. 98  
(a) Condições experimentais:  $Q = 1,0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ; Fase móvel:  
etanol/água; Coluna: 25 x 1,0 cm;  $V_{\text{injeção}} = 20 \text{ }\mu\text{L}$ ; Proporção:  
50% de piperonal/50% de safrol; Temperatura = 25°C.  
(b) Derivada primeira referente aos dados experimentais:  $B =$   
 $2,0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ;  $C = 10,0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ;  $D = 15,0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ;  $E = 20,0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ .
- Figura 24** Cromatograma referente à mistura de (1) piperonal e (2) safrol. 99  
(a) Condições experimentais:  $Q = 1,0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ; Fase móvel:  
etanol/água; Coluna: 25 x 1,0 cm;  $V_{\text{injeção}} = 20 \text{ }\mu\text{L}$ ; Proporção:  
50% de piperonal/50% de safrol; Temperatura = 35°C.  
(b) Derivada primeira referente aos dados experimentais:  $B =$   
 $2,0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ;  $C = 10,0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ;  $D = 15,0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ;  $E = 20,0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ .
- Figura 25** Esquema de uma curva de ruptura (adaptado de Gritti *et al*,2003). 100

- Figura 26** Curvas de ruptura do (a) piperonal, (b) safrol, (c) isosafrol, (d) terpinoleno. Condições experimentais:  $Q = 1,0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ; Temperatura =  $25^\circ\text{C}$ , Fase móvel: acetonitrila/água; Coluna:  $15 \times 0,39 \text{ cm}$ ; Fase estacionária =  $\text{C}_{18}$ , Detecção UV =  $245 \text{ nm}$ . 103
- Figura 27** Ajuste linear na obtenção das constantes de equilíbrio. Condições experimentais:  $Q = 1,0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ; Temperatura =  $25^\circ\text{C}$ ; Fase móvel: acetonitrila/água; Coluna:  $15 \times 0,39 \text{ cm}$ ; Fase estacionária:  $\text{C}_{18}$  104

## Lista de Tabelas

	Pg.
<b>Tabela 2.1</b> - Propriedades físicas do piperonal	4
<b>Tabela 2.2</b> - Correlação para a estimativa de $E_b$ (STARQUIT, 2004)	25
<b>Tabela 2.3</b> - Parâmetros de desempenho em cromatografia líquida semipreparativa	29
<b>Tabela 3.1</b> - Propriedades físicas das substâncias	33
<b>Tabela 3.2</b> - Composição química média dos produtos de síntese do piperonal Braga, (2007)	34
<b>Tabela 3.3</b> - Volume molar líquido e coeficiente de difusão molecular calculado pela correlação de Siddiqi e Lucas (1986).	36
<b>Tabela 3.4</b> - Propriedades físicas das misturas dos solventes utilizados.	36
<b>Tabela 3.5</b> - Composição química média da solução de trabalho.	37
<b>Tabela 4.1</b> - Parâmetros cromatográficos	44
<b>Tabela 4.2</b> - Características dos leitos.	48
<b>Tabela 4.3</b> - Constantes de Equilíbrio em ACN/H <sub>2</sub> O – 25°C	50

<b>Tabela 4.4</b> -	Constante de Equilíbrio em ACN/H <sub>2</sub> O – 35°C	51
<b>Tabela 4.5</b> -	Constantes de Equilíbrio em EtOH/H <sub>2</sub> O – 35°C	52
<b>Tabela 4.6</b> -	Coefficiente de determinação	58
<b>Tabela 4.7</b> -	Parâmetros de transferência de massa em ACN/H <sub>2</sub> O – 25°C	58
<b>Tabela 4.8</b> -	Parâmetros de transferência de massa em ACN/H <sub>2</sub> O – 35°C	59
<b>Tabela 4.9</b> -	Parâmetros de transferência de massa em EtOH/H <sub>2</sub> O – 35°C	59
<b>Tabela 4.10</b> -	Característica da transferência de massa global	61
<b>Tabela 4.11</b> -	Desvios relativos médios em percentagem ACN/H <sub>2</sub> O – 25°C	62
<b>Tabela 4.12</b> -	Desvios relativos médios em percentagem ACN/H <sub>2</sub> O – 35°C	62
<b>Tabela 4.13</b> -	Desvios relativos médios em percentagem EtOH/H <sub>2</sub> O – 35°C	63
<b>Tabela 4.14</b> -	Parâmetros de desempenho à 25°C	65
<b>Tabela 4.15</b> -	Parâmetros de desempenho à 35°C	65
<b>Tabela 4.16</b> -	Parâmetros de desempenho à 35°C	68
<b>Tabela 4.17</b> -	Cálculo do primeiro e do segundo momento da curva gaussiana	71
<b>Tabela 4.18</b> -	Parâmetros de desempenho para dez injeções.	71

**Tabela 19** - Constante de equilíbrio e coeficiente de determinação

104

# Capítulo 1

## 1. Introdução

---

Na Amazônia ocorre mais de uma centena de espécie da família *Piperaceae*. Entre estas, predominam espécies do gênero *Piper*. Em levantamento botânico e químico realizado na flora aromática da região amazônica, mais de uma espécie de *Piper* fornecem óleos essenciais. As espécies *Piper hispidinervum* e *Piper Callosum* (ambas amazônicas) são ricas em safrol. O valor industrial dessa substância decorre da presença do grupo alila existente em sua molécula, a partir da qual, com pequenas transformações químicas, obtêm-se compostos orgânicos com vasto emprego comercial, como é o caso do piperonal utilizado na indústria farmacêutica (MAIA *et al.*, 1987). O piperonal (heliotropina; 4-carboxaldeído-1,2-metilenodioxibenzeno) é um aldeído aromático com odor floral característico (SANTOS *et al.*, 2004; BRAGA, 2007).

O piperonal é um substrato adequado para síntese de vários produtos de interesse farmacêutico. Entre estas substâncias, está a piperina que é usada como anti-inflamatório; a vanilina utilizada como antioxidante; piribedil e a L-DOPA utilizados como agentes anti-Parkinson; eupaverina usada como vaso dilatador; a papaverina usada para tratamento da disfunção erétil (SANTOS *et al.*, 2004).

Uma vez que o piperonal é uma molécula extremamente versátil, purificá-la a partir de processos de síntese aplicados a substratos naturais, como é o caso essencial de pimenta longa, torna-se bastante atrativo.

A separação do piperonal a partir de uma solução de síntese com várias substâncias por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) no modo de injeção empilhada é uma alternativa aos métodos de obtenção existentes, os quais são ambientalmente prejudiciais e economicamente caros. Conseqüentemente, proporcionar processos cada vez melhores que levam à obtenção de substâncias com elevado grau de pureza, de interesse tanto para indústria farmacêutica quanto para indústria química, como o piperonal.

## 1.2. Objetivo Geral

O objetivo geral desta tese foi separar o piperonal a partir de uma solução de síntese por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) no modo semipreparativo com injeção empilhada.

## 1.3. Objetivos Específicos

Os objetivos específicos desta tese foram:

- determinar os parâmetros cromatográficos por CLAE em colunas analíticas;
- determinar a isoterma linear do piperonal, safrol, isosafrol e terpinoleno em soluções diluídas e isoterma de competição da mistura piperonal/safrol em soluções concentradas;
- determinar os coeficientes de dispersão axial ( $E_b$ ) e de difusão efetivo ( $D_{ef}$ ) do piperonal, safrol, isosafrol e terpinoleno em coluna semipreparativa;
- caracterizar a coluna semipreparativa em termo da porosidade total ( $\epsilon_t$ ) e queda de pressão ( $\Delta P$ );
- obter os parâmetros operacionais de ampliação de escala e produção;
- propor um modelo teórico que possibilite operacionalizar experimentalmente a técnica de injeção empilhada;
- analisar a pureza, recuperação e produção em escala semipreparativa.

# Capítulo 2

## 2. Revisão da literatura

---

### 2.1. Piperonal e suas propriedades

A química e a estrutura dos aldeídos são caracterizadas pela presença do grupo carbonila ( $-CO$ ). Essas substâncias possuem importância excepcional em síntese orgânica devido à elevada reatividade desse grupo. Os aldeídos simples são líquidos à temperatura ambiente. Na indústria química, são empregados como solventes, matérias-primas e síntese de outras substâncias (COSTA *et al.*, 2003).

O piperonal [(3,4-(metileno)dioxibenzaldeído)] é um aldeído aromático, sólido à temperatura ambiente e de odor característico floral (Tabela 2.1, Figura 2.1). Essa substância é muito utilizada pela indústria como matéria-prima na produção de perfumes e fármacos (TORRI *et al.*, 1984).

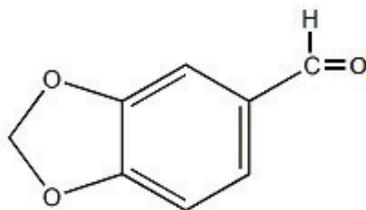


Figura 2.1 - Fórmula estrutural do piperonal.

Tabela 2.1 - Propriedades físicas do piperonal

Propriedades	Valores	Referência
Massa molar	150,13 g.mol <sup>-1</sup>	LIDE, 2011
Densidade	1,337 g.mL <sup>-1</sup>	LIDE, 2011
Ponto de ebulição	264°C	BAKER, 2004
Ponto de fusão	37°C	LIDE, 2011
Solubilidade em água	3,50 g.L <sup>-1</sup> (20°C)	YALKOWSKY e HE, 2003

### 2.1.1. Importância industrial

O piperonal tem elevada importância para indústria farmacêutica como fixador e substrato utilizado na síntese de vários produtos com atividade farmacológica bem conhecida como a piperina (anti-inflamatório); a vanilina (antioxidante); o piribedil e a L-DOPA (agentes anti-Parkison); a eupaverina (vaso dilatador); a papaverina (tratamento da disfunção erétil) conforme a Figura 2.2 (SANTOS *et al.*, 2004).

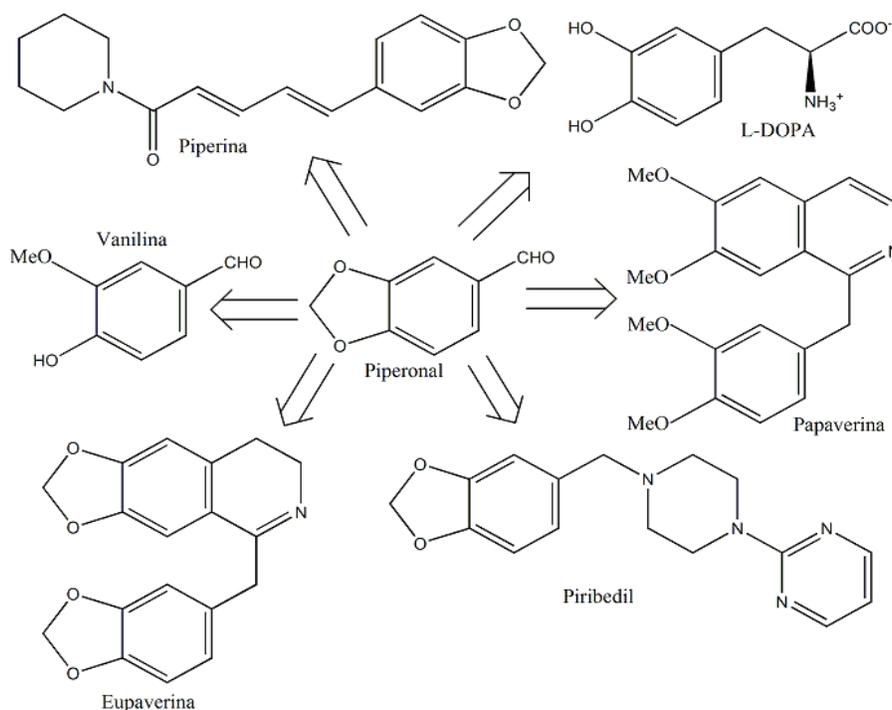


Figura 2.2 - Substâncias sintetizadas a partir do piperonal (SANTOS *et al.* 2004)

### 2.1.2. Obtenção

O piperonal tornou-se um substrato de alto valor industrial, cujos processos mais utilizados para sua obtenção são a ozonólise e a oxidação por ácido crômico a partir do isosafrol. Entretanto, a questão ambiental associada às espécies de cromo e a necessidade de grande quantidade de energia e controle cuidadoso da temperatura de reação (0 – 5°C) para a ozonólise, tem impulsionado o desenvolvimento de novas rotas sintéticas bem como novos processos menos poluentes e mais viáveis economicamente (BLAIR e HILL, 1959; FARINACCI, 1957; TORRI *et al.*, 1984).

Várias alternativas têm sido apresentadas para tornar o processo de obtenção do piperonal sustentável ambiental e economicamente. Santos *et al.* (2004) propuseram uma alternativa baseada em oxidação microbiológica do isosafrol a piperonal. O rendimento de 20%, embora seja um resultado promissor, ainda é baixo.

Uma rota sintética utilizada por Braga (2007) que consistiu na isomerização do safrol a isosafrol, seguida de oxidação eletroquímica do isosafrol a isosafrol glicol e de oxidação a piperonal proporcionou um rendimento em torno de 85%. Porém, esse procedimento foi aplicado a uma amostra de óleo essencial de pimenta longa (*Piper hispidinervum* C.DC) rica em safrol. A solução final de síntese apresentou não apenas o piperonal, mas também outras substâncias como: terpinoleno (presente no óleo), safrol e *cis,trans*-isosafrol.

### 2.2 Fase Estacionária: o grupo octadecil (C<sub>18</sub>)

A superfície da sílica é composta de grupos silanóis e pontes de siloxano. Vários tipos de silanóis podem ser identificados espectroscopicamente. Os silanóis livres sobre a superfície da sílica podem reagir com vários grupos funcionais para formar fases estacionárias quimicamente ligadas. A melhor ligação ocorre entre o silício e o carbono, pois são hidroliticamente estáveis. O clorodimetil-octadecilsilano, um organosilano, reage com os silanóis livres para formar fase estacionária C<sub>18</sub> (devido à presença do grupo alquil com dezoito carbonos) (NEUE, 1997).

A reação de silanização não ocorre com todos os silonóis presentes na superfície da sílica. Os silanóis residuais aumentam a cauda das bandas cromatográficas, prejudicando

sua simetria. Por isso muitos fabricantes submetem a sílica a uma segunda reação com um organossilano simples, geralmente trimetilsilano-cloro. Esse processo conhecido como capeamento, por mais eficiente que seja, não alcança todos os grupos silanóis residuais. Outro procedimento é uma variação da primeira reação, onde os grupos metilas são substituídos por grupos isopropila ou isobutila que provocam impedimento estérico dos silanóis livres. Este último procedimento torna a sílica mais estável, mas causa prejuízos na eficiência da coluna. Quanto ao processo de capeamento, cerca de 50% dos silanóis residuais não são atingidos pela reação (SNYDER *et al.*, 2010).

Fases reversas preparadas conforme descritos anteriormente podem hidrolisar quando utilizadas em sistemas com valores de pH menores que 3. Entretanto, são muito úteis em pH > 6. Deve-se, porém, ressaltar que a sílica dessas fases não pode ser utilizada em meio extremamente básico, porque os sítios contendo os grupos silanóis são atacados pela hidroxila. Essas fases são, também, sensíveis a variações de temperatura. Em temperaturas relativamente altas, obtêm-se melhores eficiências e seletividade, menores tempo de análise e, portanto, menores tempos de retenção. Por outro lado, pode causar, também, a deterioração da fase estacionária na coluna. Normalmente, para propósitos práticos, o intervalo de temperatura de trabalho com fases reversas tradicionais está entre 30 e 60°C. Para minimizar este efeitos, existe uma enorme variedade de fases reversas onde se pode trabalhar em sistemas com pH de 1 a 12 e em temperaturas menores que a ambiente até 90°C (CLAESSENS *et al.*, 1996; THOMPSON e CARR, 2002; CLAESSENS e VAN STRATEN, 2004; KIRKLAND, 2004).

### **2.3 Leito Fixo**

Em cromatografia líquida, Figura 2.3, o leito fixo é uma coluna recheada com adsorventes, através da qual se faz percolar uma mistura fluida, da qual se tem o interesse em separar ou analisar determinadas substâncias. Tais substâncias devem apresentar afinidade com o adsorvente ou propriedades de escoamento, suficientemente diferentes dos demais componentes presentes na mistura, de modo que é possível estabelecer condições que resultam na sua separação e análise (BRAGA, 2007).

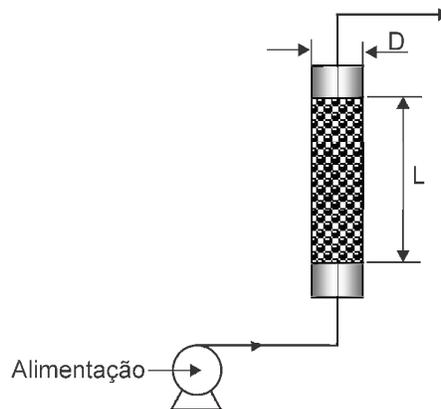


Figura 2.3 - Leito Fixo (adaptado de Braga, 2007).

Nas partículas desse leito ocorre o fenômeno de adsorção que governa a maioria das separações cromatográficas em meio líquido. De modo geral, ocorre a transferência de um determinado soluto da fase fluida para fase sólida, podendo ou não ocorrer reações químicas. Em se tratando apenas de interações físicas, o transporte do soluto entre ambas as fases desenvolve equilíbrio na superfície das partículas sólidas. Esse equilíbrio é traduzido por uma isoterma se e somente se a temperatura for constante.

### 2.3.1 Queda de pressão

Em unidades cromatográficas semipreparativas que são projetadas para trabalhar a pressões relativamente altas, torna-se necessário estabelecer uma relação entre a queda de pressão na coluna cromatográfica (por unidade de comprimento) e a velocidade intersticial da fase móvel (equação de Darcy). A equação de Kozeny-Carman é satisfatória para regime darcyniano utilizado em cromatografia (NICOUD, 2000; SILVA JÚNIOR, 2006a).

$$-\frac{\Delta P}{L} = \frac{\eta_m}{\kappa} u = \left[ \frac{\eta_m}{\frac{d_p^2 \varepsilon^3}{36\beta(1-\varepsilon)^2}} \right] u = \Phi \cdot u \quad (2.1)$$

em que  $\kappa$  representa a permeabilidade do leito,  $\beta$  o coeficiente de Kozeny (valor aproximado de 4,5),  $d_p$  o diâmetro médio de partículas e  $\eta_m$  a viscosidade dinâmica da fase móvel,  $u$  é a velocidade média intersticial da fase fluida e  $\varepsilon$ , a porosidade do leito.

## 2.4 Modelos de Isoterma de Adsorção

### 2.4.1 Modelo Linear

A isoterma de adsorção descreve a relação de equilíbrio termodinâmico entre a quantidade de soluto na fase estacionária ( $q$ ) e a quantidade de soluto na fase móvel ( $C$ ). Em soluções líquidas sob condição de diluição infinita (ou em baixas concentrações) apresentam-se na forma linear e seguem a lei modificada de Henry segundo:

$$q = k_p C \quad (2.2)$$

em que  $k_p$  é a constante de equilíbrio. Segundo Mazzotti *et al.* (1997), a seletividade ( $\alpha$ ) é definida pela razão entre a constante de equilíbrio do componente mais retido ( $j$ ) pela constante de equilíbrio do componente menos retido ( $i$ ) conforme a Equação (2.3):

$$\alpha_{ji} = \frac{k_{pj}}{k_{pi}} \quad (2.3)$$

A seletividade, também é conhecida como fator de separação, deve apresentar valor maior que 1,10 para que a separação cromatográfica seja completa na linha de base (RILEY, 1996; LANÇAS, 2009).

### 2.4.2 Modelo de Langmuir

Este modelo é usado para a maioria dos estudos de equilíbrio líquido-sólido apesar da sua natureza semi-empírica. O modelo é representado pela Equação 2.4.

$$q_i = \frac{q_{si} b_i C_i}{1 + b_i C_i} \quad (2.4)$$

em que  $q_{si}$  e  $b_i$  são a capacidade de saturação e a constante de equilíbrio de adsorção, respectivamente. O modelo supõe que a superfície do adsorvente é homogênea, ou seja,

coberta com um único tipo de sítio, que estes sítios são localizados e que não há interação entre as substâncias adsorvidas (GRITTI *et al.*, 2003a; KIM *et al.*, 2004).

Em soluções concentradas com mais de um componente onde se espera que haja competição pelos sítios de adsorção, tal competição é descrita pelo modelo de Langmuir definido conforme a Equação (2.5):

$$q_i = \frac{q_{s_i} b_i C_i}{1 + \sum_{j=1}^N b_j C_j} \quad (2.5)$$

Muitos sistemas cromatográficos são descritos por meio deste modelo de equilíbrio, que implica em seletividade constante. Entretanto, estudos já mostraram que essa restrição não é válida para vários casos de separações quirais (JACOBSON *et al.*, 1991; FONRSTEDT *et al.*, 1997; GENTILINI *et al.*, 1998; MIGLIORINI *et al.*, 2000).

#### 2.4.3 Modelo de Langmuir modificado

Para contornar eventuais variações na seletividade, à Equação (2.5) foi adicionado um termo linear que é o mesmo para ambos os componentes em misturas binárias.

$$q_i = \lambda_i C_i + \frac{q_{s_i} b_i C_i}{1 + \sum_{j=1}^N b_j C_j} \quad (2.6)$$

Vale ressaltar que esse modelo não leva em consideração a saturação da fase estacionária por causa do termo linear e a seletividade, apesar de não ser constante, deve ser maior que 1,0 (GENTILINI *et al.*, 1998).

#### 2.4.4 Modelo de bi-Langmuir

A isoterma de bi-Langmuir é usada para descrever o comportamento de adsorção se a existência de dois tipos de sítios de interação é observada, que é frequentemente o caso de separação enantiomérica (PAIS *et al.*, 1997; SCHULTE e EPPING, 2005a; XU *et al.* 2013).

$$q_i = \frac{q_{s_i} b_i C_i}{1 + \sum_{j=1}^N a_j C_j} + \frac{q_{s_i} b_i C_i}{1 + \sum_{j=1}^N b_j C_j} \quad (2.7)$$

O primeiro termo da Equação (2.7) representa as interações seletivas com a fase estacionária, enquanto que o outro, as interações não seletivas com o suporte. Além disso, a isoterma de bi-Langmuir fornece um número elevado de parâmetros o bastante para ajustar os dados experimentais para sistemas cujo mecanismo de adsorção não pode ser descrito por isotermas mais simples (JACOBSON *et al.*, 1991; GENTILINI *et al.*, 1998).

## 2.5 Método de obtenção de isoterma

### 2.5.1 Tempo de retenção binário

Para contornar os problemas relacionados à calibração do detector, consumo de tempo e reagente, Rajendran e Chen (2009) propuseram o método do tempo de retenção binário. Este método baseia-se no tempo de retenção das frentes de adsorção dos perfis das bandas cromatográficas e na constante modificada de Henry ( $k_p$ ) para estimar os parâmetros da isoterma.

A constante de equilíbrio é obtida a partir de injeções sob condições diluídas e calculada pela Equação (2.8).

$$k_{Pi} = \frac{\tau_{R_i} - 1}{F} \quad (2.8)$$

em que  $\tau_{R,i}$  é o tempo de retenção adimensional, obtido por  $\tau_{R,i} = t_R u/L$  e  $F = (1 - \epsilon)/\epsilon$ .

A obtenção dos tempos de retenção é feita pela sobrecarga da coluna: sobrecarga de massa e sobrecarga de volume. Na primeira, mantém-se o volume de injeção constante e varia-se a concentração. Na segunda, mantém-se a concentração constante e varia-se o volume de injeção. A partir dos cromatogramas, são obtidos os tempos de inflexão pela derivada primeira. A função objetivo dada pela Equação (2.9) ajusta os parâmetros da isoterma pela teoria do equilíbrio da cromatografia.

$$J = \sum_{k=1}^n \left[ (\tau_{S1,k}^{\text{exp}} - \tau_{S1,k}^{\text{calc}})^2 + (\tau_{S2,k}^{\text{exp}} - \tau_{S2,k}^{\text{calc}})^2 \right] \quad (2.9)$$

em que  $\tau_S$  é o tempo da frente de adsorção adimensional, calculado pela Equação (2.8).

## 2.6 Cromatografia líquida de alta eficiência

### 2.6.1 Parâmetros cromatográficos

Os parâmetros cromatográficos são úteis para a avaliação da eficiência de separação na coluna cromatográfica, além de fornecer informações acerca do comportamento da espécie química em estudo entre a fase estacionária e a fase móvel (SEWELL *et al.*, 1987; SILVA JÚNIOR, 2006b). Normalmente são obtidos a partir de um cromatograma conforme a Figura 2.4.

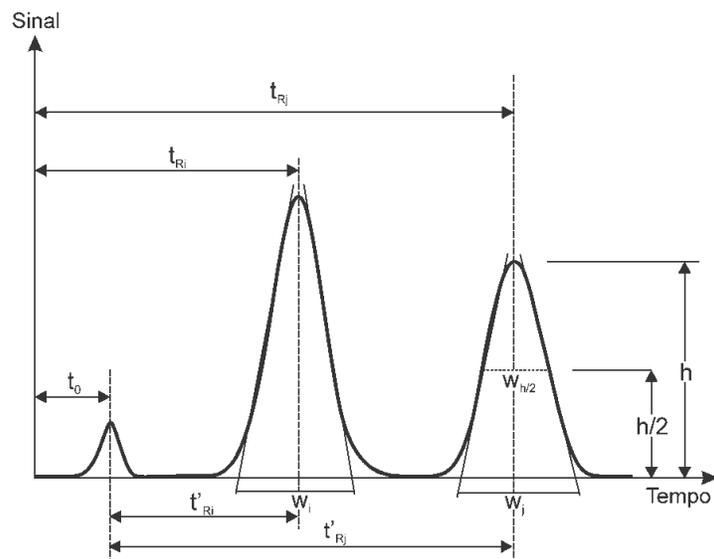


Figura 2.4 - Cromatograma esquemático.

O tempo de retenção ( $t_R$ ) é definido como o tempo que um determinado soluto em estudo permanece no sistema cromatográfico (Figura 2.4), seja na fase móvel seja na fase estacionária. Entretanto, o tempo que o soluto percorre a coluna é chamado de tempo de retenção ajustado ( $t'_R$ ) e é dado pela Equação (2.10).

$$t'_R = t_R - t_0 \quad (2.10)$$

em que  $t'_R$ ,  $t_R$  e  $t_0$  são o tempo de retenção ajustado, tempo de retenção e o tempo que as moléculas da fase móvel percorrerem a coluna, respectivamente (COLLINS *et al.*, 2006).

O fator de retenção é um parâmetro de separação extremamente importante, pois contribui na interpretação e melhoramento da qualidade dos picos de uma separação cromatográfica. Para um dado soluto, o fator de retenção ( $k$ ) é definido como a quantidade de soluto na fase estacionária pela quantidade de soluto na fase móvel. (SNYDER *et al.*, 2010). O fator de retenção pode ser obtido a partir dos tempos de retenção, conforme a Equação (2.11).

$$k = \frac{t_R - t_0}{t_0} \quad (2.11)$$

Outro parâmetro de fundamental importância é o fator de separação ( $\alpha$ ) que mede a seletividade e é a razão entre os fatores de separação dos componentes  $i$  e  $j$ . A Equação (2.12) mostra a relação que calcula esse fator (WANKAT, 1994).

$$\alpha_{ji} = \frac{t_{Rj} - t_0}{t_{Ri} - t_0} = \frac{k_j}{k_i} \quad (2.12)$$

Outra medida de separação de dois picos adjacentes é a resolução ( $R_s$ ), apresentada pela Equação (2.13). Quando  $R_s = 1$ , os dois picos estão razoavelmente separados, com somente 2% de superposição caso a quantidade dos dois componentes forem iguais. Por outro lado, caso  $R_s = 1,25$  indica boa separação e é suficiente para fins quantitativos. Se  $R_s > 1,5$  indica separação completa (COLLINS *et al.* 2006).

$$R_s = 1,177 \frac{(t_{Rj} - t_{Ri})^2}{w_{hj/2} + w_{hi/2}} \quad (2.13)$$

em que  $w_{h/2}$  é a largura a meia-altura da banda cromatográfica do componente analisado. A eficiência ou o número de pratos teóricos (N) de um sistema cromatográfico é definido como (SNYDER *et al.*, 2010):

$$N = 5,545 \left( \frac{t_R}{w_{h/2}} \right)^2 \quad (2.14)$$

Para um dado conjunto de condições experimentais, o valor de N é aproximadamente constante para diferentes bandas no cromatograma e, portanto, uma medida da eficiência da coluna. Outro parâmetro útil na comparação das eficiências de coluna é a altura equivalente a um prato teórico (HETP) e relaciona-se com N pela Equação (2.15):

$$\text{HETP} = \frac{L}{N} \quad (2.15)$$

em que L é o comprimento efetivo da coluna e HETP mede a eficiência da coluna por unidade de comprimento. Valores pequenos de HETP significam colunas mais eficientes. Esse é um dos importantes parâmetros numa análise cromatográfica (HAMILTON e SEWELL, 1978; MEYER, 2004).

## 2.7 Separação cromatográfica por eluição

Considere uma coluna cromatográfica no qual se deseja separar dois componentes, A e B, presentes em uma amostra por intermédio de eluição (Figura 2.5). Inicialmente, a fase móvel, que contém a mistura, é introduzida na coluna no tempo  $t_0$ . O eluente (solvente empregado para o transporte de A e B através da fase estacionária) desloca-se através da coluna, transportando os componentes e passando a ocorrer o transporte de matéria dos componentes A e B presentes na fase móvel para a fase estacionária. Tendo em vista que o componente A apresenta menor afinidade com o adsorvente (espécie menos retida), este será carregado pela fase móvel mais rapidamente do que o componente B, o qual apresenta maior afinidade com a fase estacionária. A diferença entre esta ação advectiva da fase

móvel faz com que ocorra a separação, entre A e B, em bandas ou zonas ao longo do comprimento da coluna (Figura 2.5a). A recuperação das espécies separadas pode ser atingida passando-se uma quantidade suficiente de fase móvel através da coluna, de tal forma que as bandas individuais, de A e B são levadas para além da coluna, momento no qual elas possam ser coletadas ou detectadas ( $t_3$  e  $t_4$  da Figura 2.5b) (SKOOG *et al.*, 2006).

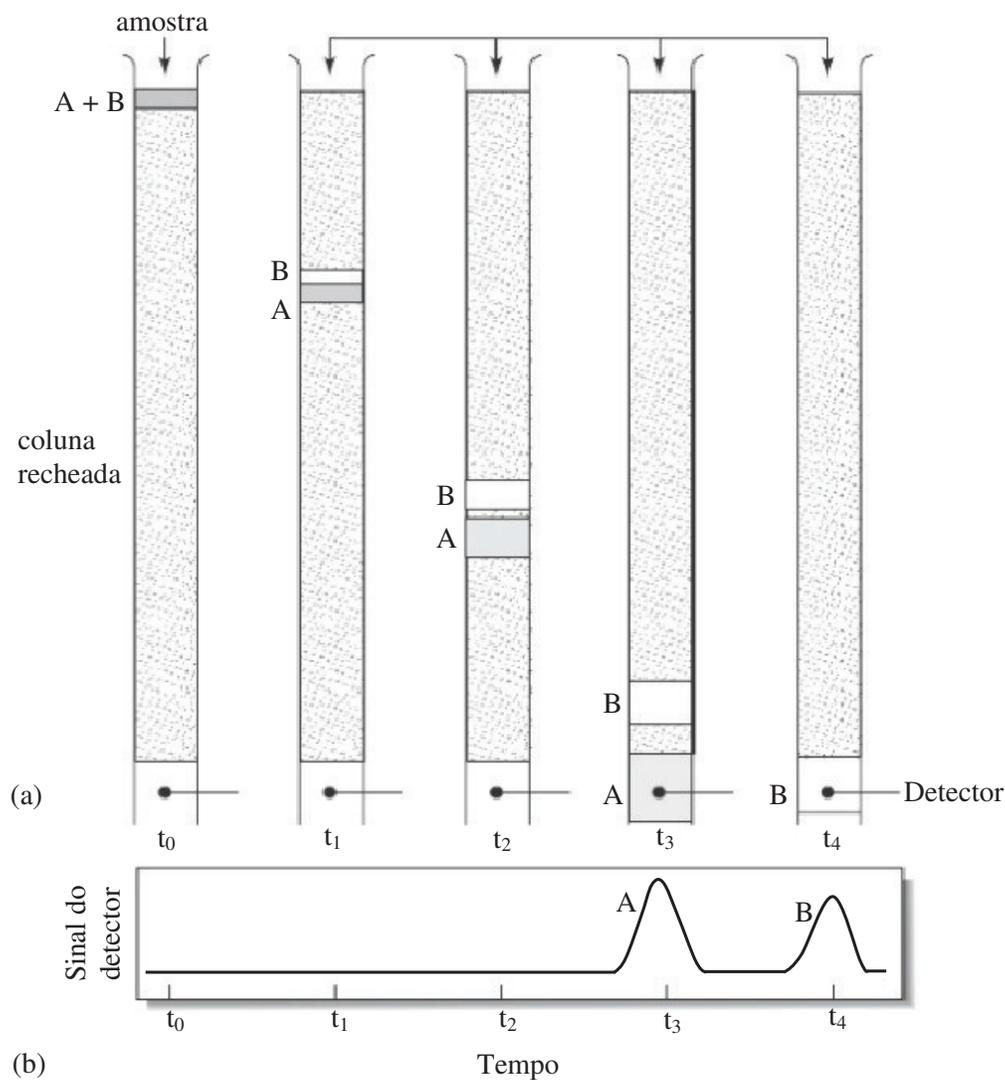


Figura 2.5 – Separação de mistura binária por eluição cromatográfica (SKOOG *et al.*, 2006).

## 2.8 Separação cromatográfica com injeção empilhada

### 2.8.1 A técnica de injeção empilhada

O conceito de injeção empilhada surgiu com o trabalho de SNYDER *et al.* (1981). Nesse trabalho, os autores apresentam uma nova abordagem para aumentar a sensibilidade na detecção de substâncias em matrizes complexas, no qual ocorre a separação parcial de um dos componentes da mistura, com desvio da fração resultante para segunda coluna.

Na década de oitenta, a injeção empilhada continuou sendo utilizada para aumentar a sensibilidade na análise de substâncias como o estriol presente na urina humana, drogas antiepiléptica presentes no soro humano e E-2-Nonenal em cerveja. Estas matrizes de amostra são complexas em termos de composição química, tornando a técnica de injeção empilhada extremamente útil (BOWERS e JOHNSON, 1982; NAZARETH *et al.*, 1984; VERHAGEN *et al.*, 1987).

Na década seguinte, a técnica de injeção empilhada passou a ser utilizada em trabalhos sobre aumento de escala, ou seja, saindo da escala analítica para escala semipreparativa e preparativa. Essa nova fase veio acompanhada da aplicação da técnica na separação de enantiômeros presentes em misturas racêmicas (OSAWA *et al.*, 1999; MILLER *et al.*, 1994, MILLER *et al.*, 1998, MILLER *et al.*, 1999). Vale destacar que foi nesse período também que surgiram trabalhos que foram realizados em cromatografia em fluido supercrítico associada à injeção empilhada, na produção de fármacos quirais (SAITO *et al.*, 1995 *apud* HORIKAWA *et al.*, 2008).

Com os avanços tecnológicos em relação aos equipamentos e acessórios (detector, bomba, válvulas e etc.) utilizados em separações cromatográficas, principalmente a partir da década passada até os dias atuais, sistemas com injeção empilhada passaram a ser automatizados tanto na análise de substâncias em matrizes complexas quanto na purificação e produção de substâncias de alto valor agregado, como os fármacos (MILLER *et al.*, 2003; White, 2005; CHEN *et al.*, 2008; LUONG *et al.*, 2012; MILLER, 2012; BAUDALETE *et al.*, 2014).

A injeção empilhada é conhecida também como injeção em vagão (“boxcar injection” em inglês), que lembra os vagões de um trem e injeção sobreposta (“overlapping injection” em inglês). Entretanto, o termo injeção empilhada é usado para definir a técnica de separação onde a segunda injeção é feita antes que todas as substâncias da primeira

injeção tenham atingido a saída da coluna. A frequência das injeções é definida para corresponder ao intervalo de tempo de separação onde todos os picos de interesse eluem de tal modo que não haja sobreposição indesejada no processo (MILLER *et al.*, 1994; SNYDER *et al.*, 1981; VENTURA, 2104).

Além de ser robusta e versátil na separação de substâncias em amostras complexas, a injeção empilhada é usada para aumentar a produtividade e a recuperação em separações semipreparativas e preparativas. Em sistemas com mais de uma coluna, contribui com a limpeza das amostras multicomponentes complexas pelo desvio do fluxo para uma segunda coluna, permitindo melhor detecção do componente de interesse (MILLER *et al.*, 1994; SNYDER *et al.*, 1997; MILLER *et al.*, 1999; MILLER *et al.*, 2003; CHEN *et al.*, 2008; DHARUMAN *et al.*, 2011).

A técnica já foi usada em associação à cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para análise de drogas, separação de fármacos quirais e produtos de fermentação. Este último é um tipo clássico de amostra complexa, onde a injeção empilhada encontra bastante aplicação (OSAWA *et al.*, 1999; CHEN *et al.*, 2008; DHARUMAN *et al.*, 2011) .

A injeção empilhada vem sendo cada vez mais empregada em associação à cromatografia em fluido supercrítico (CFS), nas separações semipreparativa e preparativa de fármacos, devido à baixa viscosidade do solvente, que permite o uso de vazões cada vez maiores, diminuindo o tempo de análise (MILLER, 2012; BAUDALETE *et al.*, 2014) .

Estudos realizados por White (2005), empregando a injeção empilhada em mistura binária, mostraram resultados excelentes quanto à pureza que foi superior a 97%, recuperação maior que 84,1 % e produção na ordem de gramas. Já Nogle *et al.* (2006) encontraram pureza superior 99% e recuperação maior que 90%, em separações de mistura multicomponente. Apesar de a pureza ser o principal parâmetro nas separações semipreparativas ou preparativas, encontrar o equilíbrio entre todos parâmetros de desempenho, torna-se tarefa fundamental nas separações cromatográficas com injeção empilhada (MILLER, 2012; BAUDALETE *et al.*, 2014; KUMAR *et al.*, 2015).

### **2.8.2 Processos de separação cromatográfica com injeção empilhada**

A separação por injeção empilhada tem como base a eluição, objetivando a coleta preferencial de um dos componentes presentes na mistura (A ou B). Tomando, por exemplo, a espécie A como sendo aquela de interesse, esta será coletada e armazenada após

passar por toda a coluna e antes que se detecte a presença da espécie B. Após completo o primeiro ciclo, insere-se a mesma quantidade da mistura (com a mesma vazão de alimentação) e procede-se de maneira análoga, ou seja: a espécie A será novamente coletada e armazenada junto daquela quantidade de A armazenada no primeiro ciclo, após passar por toda a coluna e antes que se detecte a presença da espécie B. O número de ciclos depende da produção (em massa) da espécie A, conforme a Figura 2.6.

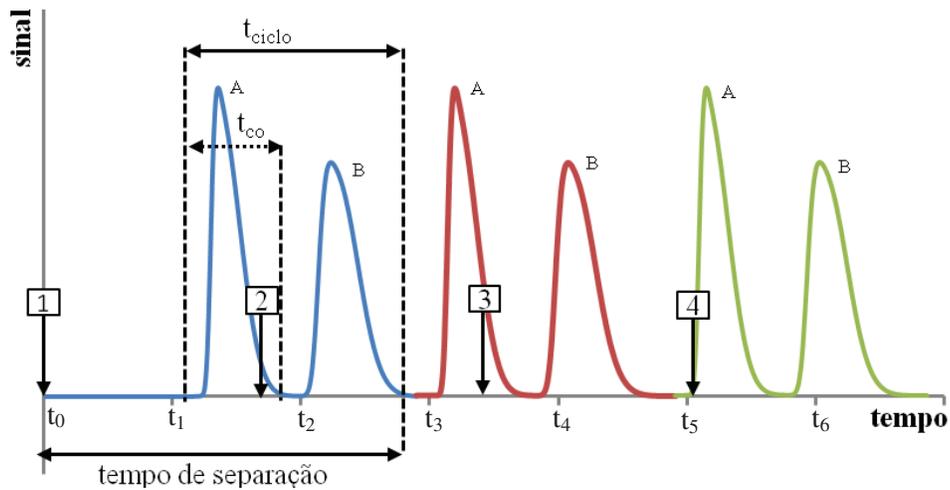


Figura 2.6 – Representação de separação por injeção empilhada.

Nota-se na Figura 2.6, que a injeção 1 ocorre no tempo  $t_0$  e antes que todos analitos dessa injeção tenham eluído da coluna (banda azul) é feita a injeção 2 (banda vermelha). Essas injeções vão se repetindo dentro de determinados ciclos de tempo (injeções 3 e 4), fazendo-se surgir bandas cromatográficas, uma após as outras, formando empilhamentos, que deram origem ao conceito de injeção empilhada.

A Figura 2.6 descreve quatro eventos de injeção empilhada e três ciclos na resolução de uma mistura binária hipotética. São essenciais neste tipo de separação as definições do tempo de coleta da espécie alvo ( $t_{co}$ ) e do tempo de ciclo da resolução (ou de separação) ( $t_{ciclo}$ ). No caso do exemplo representado pela Figura 2.6, o tempo de coleta está entre o tempo  $t_1$  e  $t_2$ , enquanto que o tempo de ciclo, está entre  $t_1$  e  $t_3$ . Para efeito de análise, supõe-se que a adsorção é regida por isothermas lineares tanto para A quanto para B e que ocorre a chamada resolução de linha de base, ou seja, a separação completa entre dois picos adjacentes ( $R_S > 1,5$ ).

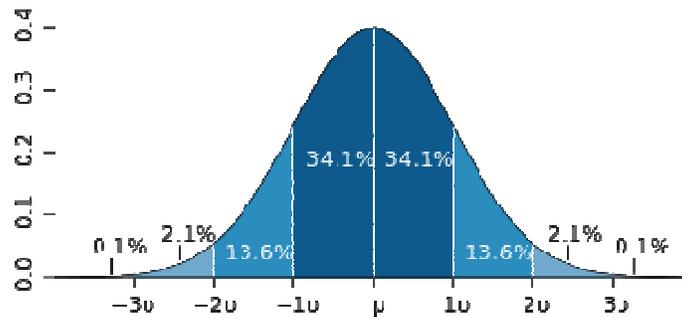


Figura 2.7 – Representação de uma gaussiana.

Neste caso, a curva cromatográfica de A ou B pode se apresentar na forma de distribuição normal (conhecida, também, como distribuição de Gauss ou gaussiana), conforme ilustra a Figura 2.7. Uma das características da gaussiana é que ela pode ser descrita por seus parâmetros de média ( $\mu$ ) e desvio padrão ( $\sigma$ ). A média, no caso em questão, está associada ao tempo de retenção, enquanto o desvio padrão está associado à largura da banda de cada espécie química, conforme a Figura 2.8 que é um redesenho do cromatograma da Figura 2.5 para explicitar os parâmetros da curva Gaussiana.

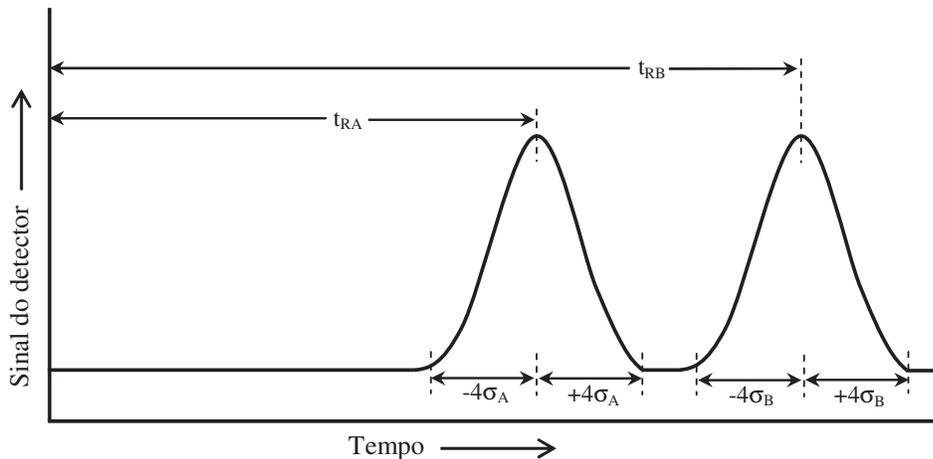


Figura 2.8 – Ilustração dos parâmetros da curva gaussiana.

Há de se mencionar que a área da banda A ou B, junto à linha de base da Figura 2.8, corresponde a 99,73 % da área total da banda, considerando  $\pm 3\sigma$  e 100%, considerando  $\pm 4\sigma$ .

Assim sendo, o tempo inicial e tempo final são definidos conforme as equações a seguir:

$$t_i = t_{RA} - 4\sigma_A \quad (2.16)$$

$$t_f = t_{RB} + 4\sigma_B \quad (2.17)$$

em que  $t_{RA}$  é o tempo de retenção médio do componente A,  $-4\sigma_A$  é tempo em que surge o sinal do componente A (menos retido),  $t_{RB}$  é o tempo médio do componente B (mais retido) e  $+4\sigma_B$  corresponde ao tempo em que o sinal do componente B atinge a linha de base do cromatograma. Dessa maneira, o tempo de ciclo é descrito pela Equação (2.18):

$$t_c = t_f - t_i \quad (2.18)$$

O tempo de coleta ( $t_{co}$ ), por sua vez, é voltado à molécula de interesse que, na presente situação é a molécula A. Este tempo situa-se no intervalo:

$$t_{RA} - 4\sigma_A \leq t_{co} \leq t_{RA} + 4\sigma_A \quad (2.19)$$

Nota-se nas Equações 2.16 – 2.19, que tanto o tempo de ciclo quanto o tempo de coleta não estão atrelados ao tempo morto da coluna como os parâmetros cromatográficos. Isto é uma vantagem, por exemplo, para misturas onde os componentes tem uma forte interação com o adsorvente. Essa interação forte, normalmente, levará a um maior tempo de retenção e cada injeção necessitará da inserção do tempo morto nos cálculos. Isto aumentará o tempo de ciclo bem como o tempo de análise, que será uma situação indesejada no processo de separação.

Com o tempo de ciclo e o tempo de coleta, projeta-se a programação dos eventos de injeção empilhada no sistema cromatográfico de acordo com a produção e purzas desejadas.

Em se tratando de uma mistura multicomponente (n componentes), conforme ilustra a Figura 2.9, da qual se deseja recuperar a molécula j (1 ou 2), mantém-se a Equação (2.16) e as Equações (2.17) e (2.19) podem ser retomadas tal como se segue:

$$t_f = t_{R_n} + 4\sigma_n \quad (2.20)$$

$$t_{R_j} - 4\sigma_j \leq t_{co} \leq t_{R_j} + 4\sigma_j \quad (2.21)$$

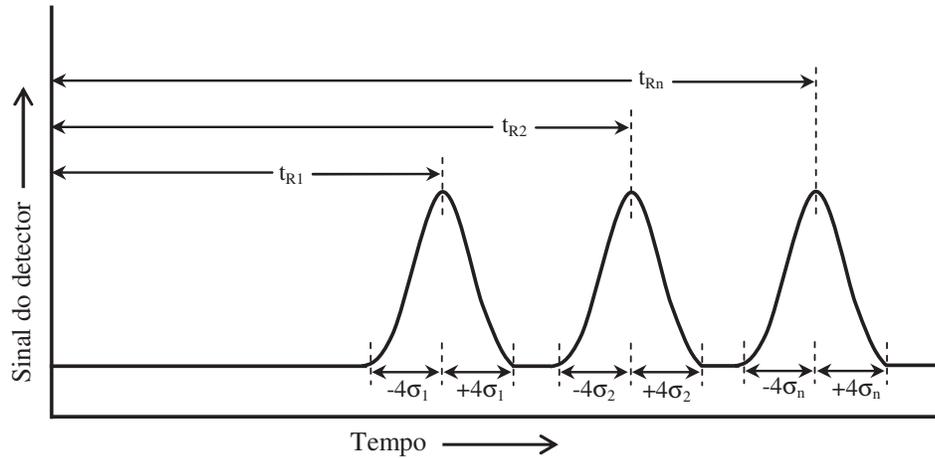


Figura 2.9 – Ilustração de um ciclo de resolução empilhada para n componentes.

## 2.9 Proposição de modelo para a separação cromatográfica empilhada

Há de se notar que as definições do tempo de ciclo e do tempo de coleta são governadas por parâmetros cromatográficos, que estão intimamente associados com primeiro e segundo momentos da curva cromatográfica. No presente modelo proposto nesta Tese, assume-se que a descrição da curva cromatográfica do soluto é governada pelas seguintes hipóteses: (a) sistema líquido contém somente uma espécie a ser adsorvida; (b) a fase móvel está diluída do soluto; (c) a adsorção é descrita somente pela etapa linear de sua isoterma de adsorção; (d) o mecanismo difusivo do líquido no interior dos poros da fase estacionária é governado pela difusão em paralelo por meio do mecanismo de difusão nos poros e superficial; (e) admite-se a existência de resistência externa à difusão interna do soluto. Desse modo, podem-se escrever as seguintes equações de balanço (SCHNEIDER e SMITH, 1968; CREMASCO *et al.*, 2001):

*Balanço de massa do soluto na fase móvel*

$$\frac{\partial C}{\partial t} = E_b \frac{\partial^2 C}{\partial z^2} - u \frac{\partial C}{\partial z} - \left( \frac{1-\varepsilon}{\varepsilon} \right) \frac{3k_f}{R_p} \left( C - c_p \Big|_{r=R_p} \right) \quad (2.22)$$

*Balanço de massa do soluto na fase porosa, considerando o equilíbrio linear:*

$$\varepsilon_p \left( \frac{\partial c_p}{\partial t} \right) + (1-\varepsilon_p) \left( \frac{\partial q}{\partial t} \right) = \frac{1}{r^2} \frac{\partial}{\partial r} r^2 \left[ \varepsilon_p D_p \left( \frac{\partial c_p}{\partial r} \right) + (1-\varepsilon_p) D_s \left( \frac{\partial q}{\partial r} \right) \right] \quad (2.23)$$

em que  $u$ ,  $E_b$  e  $k_f$  são a velocidade intersticial da fase fluida, o coeficiente de dispersão axial e o coeficiente de transferência de massa no filme. Na Equação (2.33), o termo entre colchetes refere-se ao coeficiente de difusão efetivo ( $D_{ef}$ ) o qual apresenta a contribuição do coeficiente de difusão nos poros ( $D_p$ ) e do coeficiente de difusão superficial ( $D_s$ )

No trabalho de Schneider e Smith (1968) o coeficiente de dispersão axial ( $E_b$ ) presente na Equação (2.22), está dividido pela porosidade do leito e o coeficiente efetivo de difusão ( $D_{ef}$ ), presente na Equação (2.23), está dividido pela porosidade da partícula. Nesta Tese, houve a correção da equação da continuidade do soluto em ambas as fases (CREMASCO *et al.*, 2001). As condições iniciais que descrevem a injeção do pulso do soluto na coluna cromatográfica são dadas por (SCHNEIDER e SMITH, 1968):

$$z = 0; \quad 0 \leq t < t_0; \quad C = c_0 \quad (2.24)$$

$$z = 0; \quad t > t_0; \quad C = 0 \quad (2.25)$$

$$z > 0; \quad t = 0; \quad C = 0 \quad (2.26)$$

$$r \geq 0; \quad t = 0; \quad c_p = 0 \quad (2.27)$$

$$\frac{\partial c_p}{\partial r} \Big|_{r=0} = 0 \quad (2.28)$$

Os primeiro ( $\mu$ ) e segundo ( $\sigma$ ) momentos da curva cromatográfica estão relacionados à altura e à largura dessa curva (ver Figura 2.7). Tais parâmetros são definidos de acordo com (MIYABE e SUZUKI, 1992):

$$\mu = \frac{\int_0^{\infty} C(t)tdt}{\int_0^{\infty} C(t)dt} \quad (2.29)$$

$$\sigma^2 = \frac{\int_0^{\infty} C(t)(t - \mu)^2 dt}{\int_0^{\infty} C(t)dt} \quad (2.30)$$

Diversos autores (SCHNEIDER e SMITH, 1968; HEYNES, 1975) utilizaram-se da transformada de Laplace-Carson aplicada nas equações de balanço que descrevem a função do pulso cromatográfico, obtendo analiticamente o primeiro e o segundo momentos da curva cromatográfica. No caso das Equações de (2.22) a (2.30) esses parâmetros são iguais, respectivamente, a:

$$\mu = \frac{L}{u} \left[ 1 + \left( \frac{1-\varepsilon}{\varepsilon} \right) K \right] + \frac{t_0}{2} \quad (2.31)$$

$$\sigma^2 = \left( \frac{2L}{u} \right) \left( \frac{E_b}{u^2} \right) \left[ 1 + \left( \frac{1-\varepsilon}{\varepsilon} \right) K \right]^2 + \left( \frac{2L}{u} \right) \left( \frac{1-\varepsilon}{\varepsilon} \right) K^2 \left( \frac{d_p}{6k_f} + \frac{d_p^2}{60D_{ef}} \right) + \frac{t_0^2}{12} \quad (2.32)$$

em que  $L$  é o comprimento do leito,  $u$  é a velocidade intersticial,  $E_b$  é o coeficiente de dispersão axial,  $k_f$  é o coeficiente de transferência de massa no filme e  $D_{ef}$  é o coeficiente de difusão efetivo. Este último parâmetro é dado pela equação (2.34) que traduz as contribuições tanto do mecanismo de difusão nos poros descritos por  $D_p$  quanto o mecanismo de difusão superficial representado por  $D_s$ . Já na Equação (2.31) aparece o parâmetro  $K$  que é definido pela Equação (2.33).

$$K = \varepsilon_p + (1 - \varepsilon_p)k_p \quad (2.33)$$

$$D_{ef} = \varepsilon_p D_p + (1 - \varepsilon_p)k_p D_s \quad (2.34)$$

Nota-se na Equação (2.31) a sua dependência de grandezas características tanto da coluna cromatográfica, por meio do seu comprimento efetivo ( $L$ ) e fração de vazios ( $\varepsilon$ ), quanto da partícula de adsorvente, segundo a sua porosidade ( $\varepsilon_p$ ). Além desses parâmetros, o primeiro momento cromatográfico – para isotermas lineares – apresenta associação com a constante de equilíbrio ( $k_p$ ). Usualmente, tais valores podem ser obtidos de maneira experimental. Já a Equação (2.32), que está associada ao segundo momento da curva cromatográfica, tanto considera as dependências recém-apresentadas quanto é fortemente dependente de grandezas relativas à transferência de massa como o coeficiente convectivo de transferência de massa ( $k_f$ ), coeficiente de dispersão axial ( $E_b$ ) e coeficiente efetivo de difusão ( $D_{ef}$ ).

Em se tratando do coeficiente convectivo de transferência de massa, a correlação de Wilson e Geankoplis (1966) é particularmente interessante para sistemas líquidos e no intervalo para o número de Reynolds da partícula igual a  $0,0053 < Re_p < 30$ .

$$Sh_p = \frac{d_p k_f}{D_{AB}} = \frac{1,09}{\varepsilon} Pe_{M_p}^{1/3} \quad (2.35)$$

em que  $D_{AB}$  é coeficiente livre de difusão molecular e  $Pe_M$  é o número de Peclet mássico da partícula definido como se segue:

$$Pe_{M_p} = \frac{\epsilon u d_p}{D_{AB}} \quad (2.36)$$

O coeficiente de difusão nos poros, presente na Equação (2.34), pode ser estimado a partir da correlação de Mackie e Meares (1955) (Equação 2.37) ou pela correlação de Coulson e Richardson (1968) (Equação 2.38):

$$D_p = \frac{\epsilon_p}{(2 - \epsilon_p)^2} D_{AB} \quad (2.37)$$

$$D_p = \left( \frac{\epsilon_p}{\tau} \right) D_{AB} \quad (2.38)$$

em que  $\tau$  é a tortuosidade da partícula porosa.

Nas Equações (2.35) a (2.38) existe a presença do coeficiente livre de difusão o qual pode ser obtido a partir da correlação de Siddiqi e Lucas (1986):

$$D_{AB} = 2,98 \times 10^{-7} \left( \frac{1}{V_{bA}^{0,5473} \eta^{0,026}} \right) \left( \frac{T}{\eta} \right) \quad (2.39)$$

em que  $V_{bA}$ ,  $\eta$ ,  $T$  são o volume molar do eluente à temperatura normal de ebulição, a viscosidade dinâmica, temperatura absoluta em (K), respectivamente.

A dispersão axial é um importante fenômeno que ocorre no interior de leitos fixos recheados de partículas. Há várias variáveis que devem ser consideradas no estudo desse fenômeno, como o comprimento do leito, o tamanho das partículas e a velocidade do fluido, entre outras (DELGADO, 2006).

A dispersão axial no interior do leito pode ser obtida experimentalmente a partir do segundo momento da curva cromatográfica, mas também, pode ser estimada por algumas das correlações na literatura dentro de certas condições preestabelecidas. Algumas das correlações bastante utilizadas são apresentadas na Tabela 2.2.

Tabela 2.2. Correlação para a estimativa de  $E_b$  (STARQUIT, 2004)

Autor	Validade	Correlação	Equação
Chung e Wen (1968)		$\frac{E_b}{\varepsilon u d_p} = \frac{\varepsilon}{0,2 + 0,0011 \cdot Re_p^{0,48}}$	(2.40)
Koch e Brady (1985)	$Pe_{M_p} \gg 1$	$\frac{E_b}{\varepsilon u d_p} = \varepsilon \left[ \frac{3}{4} + \frac{\pi^2}{6} (1-\varepsilon) \ln(Pe_{M_p}) + \frac{1}{Pe_{M_p}} \right]$	(2.41)
Gunn (1987)	$0,03 < Re_p < 500$	$\frac{E_b}{\varepsilon u d_p} = \left( \frac{Z_p \cdot (1-p)^2 + Z_p^2 \cdot p \cdot (1-p)^3}{\left( \exp\left( \frac{-1}{p \cdot (1-p) \cdot Z_p} \right) - 1 \right)} \right) + \frac{\varepsilon}{\tau Pe_{M_p}}$ <p>com <math>Z_p = \frac{Pe_{M_p}}{4\alpha_l^2(1-\varepsilon)}</math></p> $p = 0,17 + 0,33 \exp\left( -\frac{24}{Re_p} \right)$ $\alpha_l = 2,405 \quad e \quad \tau = 1,4$	(2.42)
Athayle <i>et al.</i> (1992)	$7 < Pe_{M_p} < 320$ $Re_p < 1$	$\frac{E_b}{\varepsilon u d_p} = \left( \frac{Pe_{MP}}{1-\varepsilon} \right)^{1/6}$	(2.43)

## 2.10 Obtenção experimental dos momentos da curva cromatográfica

O modo adequado para verificar o desempenho do modelo proposto é a sua validação via ensaios experimentais de cromatografia, utilizando-se a técnica do pulso cromatográfico, do qual é gerada a curva cromatográfica. Dessa maneira, torna-se possível a obtenção dos momentos cromatográficos. A partir das hipóteses que permitiram a obtenção das Equações (2.31) e (2.32), é possível estabelecer uma relação entre a eficiência da coluna, por meio da altura equivalente a um prato teórico (HETP) e os momentos (VANDEEMTER *et al.*, 1956; ARNOLD *et al.*, 1985; GUIOCHON *et al.*, 2006), Segundo:

$$\text{HETP} = \left( \frac{\sigma'^2}{t_R^2} \right) L \quad (2.44)$$

com

$$\sigma'^2 = \sigma^2 - \frac{t_0^2}{12} \quad (2.45)$$

$$t_R = \mu - \frac{t_0}{2} \quad (2.46)$$

Considerando-se as Equações (2.45) e (2.46) e substituindo as Equações (2.30) e (2.31) na Equação (2.44), bem como fazendo as manipulações algébricas adequadas, tem-se:

$$\text{HETP} = 2 \left( \frac{E_b}{u} \right) + 2u \left( \frac{1-\varepsilon}{\varepsilon} \right) \frac{1}{K} \left[ 1 + \left( \frac{\varepsilon}{1-\varepsilon} \right) \frac{1}{K} \right]^{-2} \left( \frac{d_p}{6k_f} + \frac{d_p^2}{60D_{ef}} \right) \quad (2.47)$$

A Equação (2.47) pode ser rearranjada e desmembrada do modo como se segue (CREMASCO *et al.*, 2001):

$$\text{HETP}_{\text{mod}} = \text{HETP} - 2u \left( \frac{1-\varepsilon}{\varepsilon} \right) \frac{1}{K} \left[ 1 + \left( \frac{\varepsilon}{1-\varepsilon} \right) \frac{1}{K} \right]^{-2} \left( \frac{d_p}{6k_f} \right) \quad (2.48)$$

na qual

$$\text{HETP}_{\text{mod}} = 2 \left( \frac{E_b}{u} \right) + 2u \left( \frac{1-\varepsilon}{\varepsilon} \right) \frac{1}{K} \left[ 1 + \left( \frac{\varepsilon}{1-\varepsilon} \right) \frac{1}{K} \right]^{-2} \left( \frac{d_p^2}{60D_{ef}} \right) \quad (2.49)$$

Parametrizando-se a Equação (2.49), tem-se a equação da reta:

$$\text{HETP}_{\text{mod}} = \beta + \alpha u \quad (2.50)$$

A partir do coeficiente angular da reta obtida ( $\alpha$ ), é possível obter coeficiente efetivo de difusão e da intersecção ( $\beta$ ), o coeficiente de dispersão axial.

## 2.11 Obtenção experimental das porosidades e constante de equilíbrio termodinâmico

Há de se observar na Equação (2.49) a necessidade de se conhecer tanto a fração de vazios (porosidade da coluna), quanto da porosidade da partícula ( $\epsilon_p$ ). Para a determinação da porosidade do leito, utiliza-se uma molécula cujo tamanho é maior do que o dos poros das partículas que compõem a fase estacionária, além de não apresentar afinidade termodinâmica com a fase estacionária. Assim sendo, essas moléculas passam apenas nos interstícios da coluna. Dessa maneira, o parâmetro  $k_p$ , presente na Equação (2.33) é igual a zero ( $k_p = 0$ ) sendo, por via de consequência, possível retomar a Equação (2.31), considerando-se a Equação (2.46), tal como se segue,

$$t_R = \frac{L}{u} \quad (2.51)$$

Utilizando-se a relação entre a velocidade intersticial ( $u$ ) e velocidade superficial ( $u_0$ )

$$u = \frac{u_0}{\epsilon} \quad (2.52)$$

Sendo  $u_0$  definida como a razão entre a vazão volumétrica ( $Q$ ) da fase móvel e a área da seção transversal da coluna ( $A$ ) em que  $A = \pi D^2/4$  ( $D$ , diâmetro da coluna), a Equação (2.51) é retomada segundo:

$$t_R = \frac{L}{u_0} \epsilon \quad (2.53)$$

O coeficiente angular da reta de  $t_R$  vs.  $L/u_0$  é a porosidade da coluna  $\varepsilon$ . Por outro lado, a porosidade da partícula ( $\varepsilon_p$ ) pode ser obtida utilizando-se molécula que não tenha nenhum tipo de interação com a fase estacionária (traçador inerte) e possa penetrar em todos os poros. Assim sendo, a Equação (2.33) fica  $K = \varepsilon_p$  e possibilita retomar a Equação (2.31), considerando-se as Equações (2.46) e (2.53), tal como se segue:

$$t_R = \frac{L}{u_0} [\varepsilon + (1 - \varepsilon)\varepsilon_p] \quad (2.54)$$

O termo entre colchetes é a definição de porosidade total e corresponde ao coeficiente angular da reta obtida pelo gráfico de  $t_R$  vs.  $L/u_0$ . Com a Equação (2.55), calcula-se a porosidade da partícula a partir do valor conhecido da porosidade do leito.

$$\varepsilon_t = \varepsilon + (1 - \varepsilon)\varepsilon_p \quad (2.55)$$

Nota-se que a obtenção dos valores de porosidade do leito e da partícula decorre diretamente da análise experimental do primeiro momento da curva cromatográfica, considerando-se que as moléculas utilizadas em tais ensaios não apresentam afinidade com a fase estacionária. Por outro lado, ao se considerar que uma determinada molécula possa apresentar afinidade com o adsorvente e esta relação é linear, substituem-se as Equações (2.33) e (2.55) na Equação (2.31), considerando-se a Equação (2.46):

$$t_R = \frac{L}{u} \left[ 1 + \left( \frac{1 - \varepsilon}{\varepsilon} \right) (\varepsilon_p + (1 - \varepsilon_p)k_p) \right] \quad (2.56)$$

Para simplificar a determinação experimental da constante de equilíbrio, substitui-se a velocidade intersticial ( $u = u_0/\varepsilon$ ) e a porosidade da partícula ( $\varepsilon_p = \varepsilon_t - \varepsilon/1 - \varepsilon$ ) na Equação (2.56), que manipulada adequadamente, resulta em (FERRARI, 2014):

$$t_R = \frac{L}{u_0} [\varepsilon_t + (1 - \varepsilon_t)k_p] \quad (2.57)$$

A Equação (2.57) assume a forma da equação da reta cujo coeficiente angular associado à porosidade total fornece a constante de equilíbrio sob condição de diluição infinita.

## 2.12 Parâmetros de desempenho

Em processos de separação em larga escala, como as separações semipreparativas, costuma-se eleger parâmetros pelos quais se possa avaliar o seu desempenho, conforme a Tabela 2.3.

Tabela 2.3 - Parâmetros de desempenho em cromatografia líquida semipreparativa

Parâmetro	Equação	
<b>Tamanho da amostra</b>	$n_i = c_{0,i} V_{inj}$	(2.58)
<b>Fator de carga</b>	$L_{f,i} = \frac{n_i}{(1-\varepsilon)A_t L_{q_{s,i}}}$	(2.59)
<b>Recuperação</b>	$Y = \frac{n_i - A_i}{n_i}$	(2.60)
<b>Pureza</b>	$P_i = \frac{n_i - A_i}{n_i - A_i + B_i}$	(2.61)
<b>Produção</b>	$Pr_i = \frac{V_{inj} c_{0,i} Y_i}{t_c}$	(2.62)
<b>Consumo de solvente</b>	$CS_i = \frac{Pr_i}{u}$	(2.63)
<b>Produtividade específica</b>	$SP_i = \frac{1}{CS_i}$	(2.64)

em que  $c_{0,i}$  é a concentração da solução de alimentação,  $V_{inj}$  é o volume de injeção,  $A_t$  é a área da secção transversal da coluna,  $q_{s,i}$  é a capacidade de saturação,  $A_i$  é a quantidade do componente  $i$  na segunda fração e  $B_i$  é a quantidade do componente  $i$  na primeira fração (GOLSHAN-SHIRAZI e GUIOCHON, 1989).

Separções cromatográficas por injeção empilhada apresentam os parâmetros listados na Tabela 2.3. Dentre esses parâmetros, os mais relevantes são a pureza, a

recuperação e produção e na prática busca-se um equilíbrio entre esses três parâmetros como mostra a Figura 2.10 (HUBER e MAJORS, 2007).

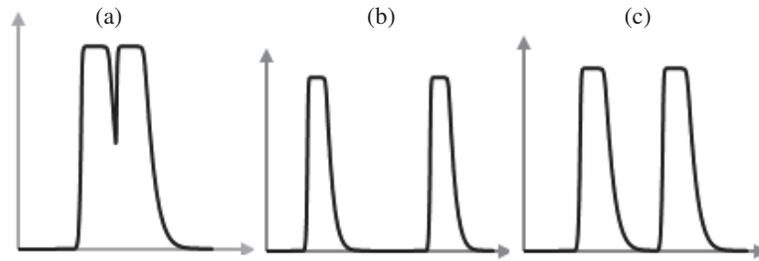


Figura 2.10 - Comportamento dos parâmetros de desempenho (adaptado de Huber e Majors, 2007).

Conforme a Figura 2.10, o cromatograma (a) apresenta alta produção, mas é pobre em pureza e recuperação, já o cromatograma (b) apresenta alta pureza e recuperação, mas produção baixa, pois os tempos de ciclos serão mais longos. Por último, o cromatograma (c) representa a condição ótima de separação.

# Capítulo 3

## 3. Materiais e métodos

---

O procedimento experimental desta Tese compreende as seguintes etapas gerais: empacotamento das colunas; caracterização das colunas empacotadas; seleção do comprimento de onda para detecção do piperonal, safrol, isosafrol e terpinoleno; preparo da solução de trabalho; determinação dos parâmetros cromatográficos; determinação das isotermas linear e não-linear; determinação dos parâmetros de transferência de massa; procedimentos de separação por injeção empilhada. Esta Tese foi conduzida no Laboratório de Processos de Transferência de Massa (LPTM), do Departamento de Engenharia de Processos (DEPRO), da Faculdade de Engenharia Química, da Universidade de Estadual de Campinas (FEQ/UNICAMP).

### 3.1. Materiais e Equipamentos

**Sistema Cromatográfico:** a aparelhagem consistiu de cromatógrafo líquido Shimadzu (Kyoto, Japão), composto por duas bombas LC-20AT e LC-10AD, com injetor manual (Rheodyne, Modelo 7725i, Califórnia) e alça de amostragem de 20 a 800  $\mu\text{L}$ , detector ultravioleta SPD-20A. Todas essas unidades são interligadas por uma interface CMB-20A e operados por computador, por meio do qual os cromatogramas foram registrados pelo *software LC Solution*. A temperatura da coluna foi controlada por banho termostático (Quimis, modelo Q-214m2, Brasil), conforme a Figura 3.1.

As separações cromatográficas foram realizadas em coluna analítica (25 x 0,46 cm) e semipreparativa (25 x 1,0 cm). As medidas de massa empregadas foram feitas em balança analítica (Mettler, modelo AJ150, Suíça) e as medidas de volume foram feitas com pipetas automáticas de 200  $\mu\text{L}$ , 1000  $\mu\text{L}$  e 5000  $\mu\text{L}$ .

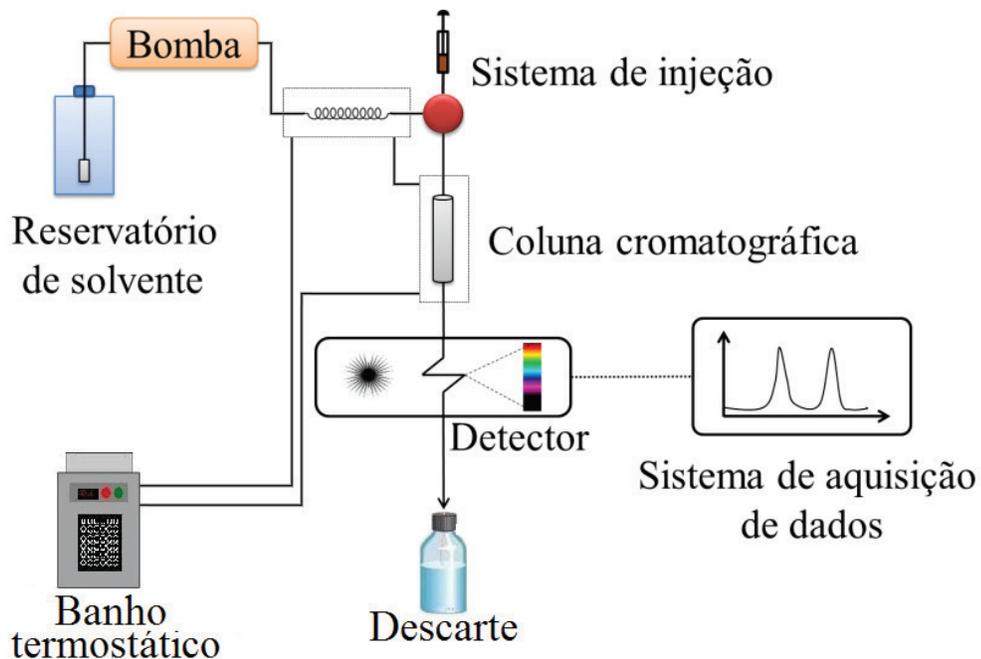


Figura 3.1 - Sistema Cromatográfico (adaptado de FERRARI, 2014).

### 3.2 Reagentes

Para obtenção das curvas de calibração do piperonal, safrol, isosafrol e terpinoleno bem como das soluções de trabalho foram utilizados os padrões de safrol (pureza de 97 %, Sigma, USA), piperonal (pureza de 99 %, Aldrich, USA), isosafrol (pureza de 99,5 %, Chem Service, USA) e terpinoleno (pureza de 85 %, Flukar, USA), Conforme a Tabela 3.1. As colunas analítica e semipreparativa foram empacotadas com sílica recoberta com octadesilsilano ( $C_{18}$ ), cujo tamanho médio de partícula é 20  $\mu\text{m}$  com porosidade de partícula de 0,357 (Grace Pure, Vydac 150HC, USA). Para verificação do empacotamento foi utilizado tolueno (Sigma-Aldrich, 99 %, USA). Os solventes que constituíram as fases móveis foram a acetonitrila (J. T. Baker; grau HPLC, São Paulo, Brasil), etanol (J. T. Baker; grau HPLC, São Paulo, Brasil) e água ultrapura Milli Q, 18  $\text{m}\Omega$  (Millipore, Direct-Q3, Brasil). Utilizaram-se duas fases móveis: etanol/água – 70/30 (v/v) e acetonitrila/água – 70/30 (v/v) cujo pH foi de 6,12 (24,3°C) e 6,48 (25,5°C), medidos em pH AJX – 522, da Micronal. Para as determinações de tempo morto e porosidade, utilizou-se uracil (Sigma, pureza de 98%) como traçador inerte. Todos os solventes foram filtrados à vácuo em

membrana PTFE modificado, de 0,45  $\mu\text{m}$  de porosidade (Millipore, São Paulo) e degaseificados em banho de ultrassom (8892R-MT, Cole-Parmer, USA).

Tabela 3.1 - Propriedades físico-químicas das substâncias

Substância	M ( $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ )	P <sub>vap</sub> (mmHg)	$\rho$ ( $\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$ )	P. F. ( $^{\circ}\text{C}$ )	P. E. ( $^{\circ}\text{C}$ )
Safrol	162,1852	1,0 (87 $^{\circ}\text{C}$ )	1,095*	11,2 <sup>a</sup>	234,5 <sup>a</sup>
Piperonal	150,1314	1,0 (63,8 $^{\circ}\text{C}$ )	1,337*	37,0 <sup>a</sup>	263,0 <sup>a</sup>
Isosafrol	162,1852	0,025 (25 $^{\circ}\text{C}$ )	1,121*	6,8 <sup>a</sup>	253,0 <sup>a</sup>
Terpinoleno	136,28	~0,5 (20 $^{\circ}\text{C}$ )	0,861*	-	-
Acetonitrila	41,05	-	0,786*	- 45,0	82,0
Etanol		-	-	-	-

<sup>a</sup>(LIDE, 2011); \* à 25 $^{\circ}\text{C}$ . P. F.: ponto de fusão; P. E.: ponto de ebulição.

### 3.3 Métodos

#### 3.3.1 Empacotamento de coluna

As colunas foram empacotadas com fase estacionária C<sub>18</sub>, cujo tamanho médio da partícula foi de 20  $\mu\text{m}$ , utilizando bomba LC-6AD, da marca Shimadzu. Cada coluna recebeu cerca de ¼ de fase estacionária. Em seguida era acoplada à bomba na qual se imprimia uma vazão de 1,0  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$  de metanol (Tedia Brasil, grau HPLC, Brasil) por 5 min. Posteriormente, adicionava-se mais ¼ de fase estacionária e procedia-se como acima descrito até o enchimento completo da coluna. Com a coluna cheia, deixou-se circulando a fase móvel a uma vazão 0,2  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$  por 24 h, observando-se sempre a estabilidade da pressão.

As colunas semipreparativas foram empacotadas com bomba pneumática de alta pressão (Harskel, DSTV-100, USA), utilizando metanol (Tedia Brasil, grau HPLC, Brasil) e nitrogênio (grau analítico 2.5, White Marins, Brasil). Foi pesado cerca de 12,0 g de fase estacionária e dissolvido em 20 mL de metanol. A suspensão foi transferida para uma pré-coluna previamente presa à coluna. Em seguida, ajustou-se o manômetro para uma pressão de 7500 psi, fazendo-se escoar 1,50 L de metanol em fluxo descendente e 1,0 L em fluxo ascendente. O mesmo procedimento foi realizado em coluna analítica, sendo a massa cerca de 5,0 g e os volumes de arraste de 400 e 200 mL.

### 3.3.2 Determinação de comprimento de onda e verificação de empacotamento

Para obter informações sobre o estado do empacotamento a partir da simetria da banda cromatográfica, foi preparada uma solução 0,10 g.L<sup>-1</sup> de tolueno, à temperatura ambiente. O comprimento de onda utilizado foi de 254 nm, fase móvel acetonitrila/água e vazão de 1,0 mL.min<sup>-1</sup>.

A determinação do comprimento de onda dos componentes da solução de síntese (Tabela 3.2) foi feito da seguinte forma: em fase móvel etanol/água – 70/30 (v/v) foi preparada uma solução de concentração 0,10 g.L<sup>-1</sup> de cada componente. No cromatógrafo do item 3.1, sem a coluna, foi injetada uma solução de uracil a 0,10 g.L<sup>-1</sup> e detecção de 254 nm para se conhecer o tempo de injeção do sistema a uma vazão de 0,2 mL.min<sup>-1</sup>. Em seguida foi injetada pequena alíquota de volume da solução preparada anteriormente de cada padrão. O comprimento de onda máximo foi obtido na faixa de 190 a 370 nm, com passo de varredura de 1,0 nm. O mesmo procedimento foi aplicado ao sistema acetonitrila/água – 70/30 (v/v), nas mesmas condições, exceto pela presença da coluna e temperatura de 35°C (ver Apêndice A).

Tabela 3.2 - Composição química média dos produtos de síntese do piperonal [Braga, (2007)]

Composto	c <sub>0</sub> (g.L <sup>-1</sup> )	% espécie química	C (g.L <sup>-1</sup> )	% espécie química
Terpinoleno	1,2516x10 <sup>-3</sup>	4,39	3,7406x10 <sup>-6</sup>	0,90
Safrol	4,9708x10 <sup>-3</sup>	17,44	7,09x10 <sup>-6</sup>	1,70
<i>Cis</i> -isosafrol	1,2703x10 <sup>-5</sup>	0,04	1,1082x10 <sup>-5</sup>	2,65
<i>Trans</i> -isosafrol	4,9905x10 <sup>-3</sup>	17,51	2,0581x10 <sup>-5</sup>	4,93
Isosafrol glicol	1,7280x10 <sup>-2</sup>	60,62	0	0
Piperonal	0	0	3,5477x10 <sup>-4</sup>	84,93
Outros	-	-	2,0443x10 <sup>-5</sup>	4,89

### **3.3.3 Obtenção dos parâmetros cromatográficos**

Para obtenção dos parâmetros cromatográficos ( $k$ ,  $\alpha$ ,  $R_s$ ,  $N$ ) foi preparada uma solução com concentração total de  $0,571 \text{ g.L}^{-1}$  nas seguintes proporções: 89,3 % de piperonal, 1,79 % de safrol, 7,96 % de isosafrol, 0,950 % de terpinoleno. Essas substâncias são as espécies em maior quantidade contidas na solução de síntese desenvolvida por Braga (2007) na obtenção de piperonal diretamente do óleo de pimenta longa. A solução acima foi injetada no cromatógrafo numa vazão de  $1,0 \text{ mL.min}^{-1}$ , temperaturas de 25 e  $35^\circ\text{C}$ , volume de injeção de  $50 \text{ }\mu\text{L}$ , comprimento de onda de 245 nm, fase móvel etanol/água e acetonitrila/água -70/30 (v/v).

### **3.3.4 Determinação da porosidade total**

A porosidade total do leito foi determinada pelo método do pulso nas seguintes condições experimentais: vazões de  $0,6\text{-}1,4 \text{ mL.min}^{-1}$  (coluna analítica) e  $4,0\text{-}6,0 \text{ mL.min}^{-1}$  (coluna semipreparativa), utilizando-se uracil como traçador inerte a  $0,10 \text{ g.L}^{-1}$ . Com essas informações foi possível, também, determinar o volume morto de cada coluna, sendo  $2,692 \text{ mL}$  para a coluna analítica e  $0,565 \text{ mL}$  para coluna semipreparativa.

### **3.3.5 Determinação de isoterma linear**

Sob a condição de diluição infinita, as isotermas foram obtidas pelo método do pulso cromatográfico com as soluções-padrão de cada componente, na concentração  $0,20 \text{ g.L}^{-1}$ . As soluções foram alimentadas ao sistema cromatográfico (ver seção 3.1) nas vazões de  $0,6\text{-}1,4 \text{ mL.min}^{-1}$  e comprimento de onda de 245 nm. Para a fase móvel acetonitrila/água foram empregadas temperaturas de 25 e  $35^\circ\text{C}$ . Em fase móvel etanol/água foi usado a temperatura de  $35^\circ\text{C}$ .

### **3.3.6 Determinação de isoterma não linear**

Para obter os parâmetros da isoterma de Langmuir foram preparadas soluções cujas concentrações variaram de 2,0 a  $20,0 \text{ g.L}^{-1}$  de piperonal/safrol na proporção de 1:1. Para

isso, fez-se uma solução de 20,0 g.L<sup>-1</sup> da mistura e diluiu-se nas concentrações estabelecidas. As injeções foram realizadas no sistema cromatográfico descrito na secção 3.1. A temperatura do banho foi ajustada a 25 e 35°C para fase móvel acetonitrila/água e 35°C para etanol/água. Para evitar a saturação do detector e que o sinal ultrapasse o limite máximo detectável, foi efetuada a troca da cela do detector por uma cela com as seguintes características: caminho ótico = 6 mm, volume = 3 µL. Os tempos de retenção das frentes de adsorção das bandas cromatográficas foram utilizados para ajustar os parâmetros da Equação (2.9), usando o *software* MATLAB.

### 3.3.7 Determinação dos parâmetros de transferência de massa e queda de pressão

O coeficiente de difusão molecular dado na Tabela 3.3, as frações molares da água, acetonitrila (ACN) e etanol (EtOH) foram calculados baseados nas condições descritas no item 3.1. A viscosidade dinâmica ( $\eta$ ) e massa específica ( $\rho$ ) da fase móvel foram obtidas por interpolação dos dados experimentais de Hickey e Waghorne (2001) e Khatab *et al.*, (2012) conforme a Tabela 3.4. O volume molar líquido foi calculado pelo método descrito em Elbro *et al.* (1994).

Tabela 3.3 - Volume molar líquido e coeficiente de difusão molecular calculado pela correlação de Siddiqi e Lucas (1986).

Substância	V <sub>b</sub> (cm <sup>3</sup> .mol <sup>-1</sup> )	ACN/H <sub>2</sub> O -25°C	ACN/H <sub>2</sub> O - 35°C	EtOH/H <sub>2</sub> O - 35°C
		D <sub>AB</sub> (cm <sup>2</sup> .s <sup>-1</sup> )	D <sub>AB</sub> (cm <sup>2</sup> .s <sup>-1</sup> )	D <sub>AB</sub> (cm <sup>2</sup> .s <sup>-1</sup> )
Piperonal	56,38	1,626 x 10 <sup>-5</sup>	2,006 x 10 <sup>-5</sup>	7,221 x 10 <sup>-6</sup>
Safrol	79,03	1,352 x 10 <sup>-5</sup>	1,667 x 10 <sup>-5</sup>	6,003 x 10 <sup>-6</sup>
Isosafrol	93,17	1,235 x 10 <sup>-5</sup>	1,524 x 10 <sup>-5</sup>	5,486 x 10 <sup>-6</sup>
Terpinoleno	142,80	9,777 x 10 <sup>-6</sup>	1,206 x 10 <sup>-5</sup>	4,342 x 10 <sup>-6</sup>

A: substância; B: fase móvel.

Tabela 3.4 – Propriedades físicas das misturas dos solventes utilizados.

Propriedade	ACN/H <sub>2</sub> O - 25°C	ACN/H <sub>2</sub> O - 35°C	EtOH/H <sub>2</sub> O - 35°C
$\rho$ (g.mL <sup>-1</sup> )	0,8571	0,8472	0,8712
$\eta$ (mPa.s)	0,6092	0,5127	1,3873

Os parâmetros de transferência de massa e de dispersão axial foram obtidos na coluna semipreparativa com a solução da mistura de piperonal, safrol e terpinoleno na concentração de 0,20 g.L<sup>-1</sup> cada. O isosafrol, em solução separada, na concentração de 0,20 g.L<sup>-1</sup>. Os tempos de retenção e a largura a meia altura do pico cromatográfico foram obtidos nas vazões de 4,0 – 6,0 mL.min<sup>-1</sup>. Todas as injeções foram de 20 µL, comprimento de onda de 245 nm e nas mesmas condições de fase móvel e temperatura da Tabela 3.3. Os experimentos foram realizados em replicata e os tempos de retenção de todas as medidas foram corrigidos pelo tempo de injeção sem a coluna.

A queda de pressão do sistema cromatográfico foi obtida na faixa de vazão de 4,0 – 6,0 mL.min<sup>-1</sup>, utilizando as fases móveis acetonitrila/água e etanol/água na proporção 70/30 (v/v) a 25 e 35°C.

### 3.4 Preparo da solução de trabalho

Uma amostra foi preparada baseada nas concentrações da solução de síntese do piperonal a partir o óleo essencial de pimenta longa (*Piper hispidinervun*), obtido por Braga (2007), conforme Tabela 3.2. Dessa tabela, foram escolhidas as seguintes substâncias: o piperonal (que é molécula de interesse) e os produtos secundários que estarão presentes na solução após a realização da síntese, os quais são: o safrol, terpinoleno, *cis,trans*-isosafrol. As massas do *cis* e *trans*-isosafrol foram somadas para fornecer um único componente. Para definir as concentrações, o valor dos componentes escolhidos (piperonal, safrol, isosafrol e terpinoleno) da Tabela 3.2 foi multiplicado por um determinado volume de solução previamente selecionado, gerando os valores da Tabela 3.5.

Tabela 3.5 – Composição química média da solução de trabalho (Braga,2007)

Substância	% (m/m)	c (g.L <sup>-1</sup> )	c (g.L <sup>-1</sup> )
<b>Piperonal</b>	89,3	0,510	8,500
<b>Safrol</b>	1,79	0,010	0,170
<b>Isosafrol</b>	7,96	0,046	0,758
<b>Terpinoleno</b>	0,95	0,005	0,090

Os padrões cujo estado físico não permitiam a pesagem (safrol, isosafrol e terpinoleno) foram convertidos para grandezas adequadas mediante a conversão por meio

da densidade. A Tabela 3.5 apresenta as concentrações dos componentes para soluções diluídas e concentradas.

### 3.4.1 Separação em escala analítica

As soluções de trabalho foram preparadas com base na composição percentual massa/massa encontradas em Braga (2007) para os componentes de maior concentração na solução de síntese, a partir do óleo essencial de pimenta longa (Tabela 3.5). Foram preparadas duas soluções: a primeira, composta por piperonal e safrol (mistura binária) e a segunda, com todos os componentes da solução de síntese (piperonal, safrol, isosafrol e terpinoleno – mistura multicomponente). Na preparação da mistura binária, os valores do isosafrol foram adicionados aos valores do safrol e a quantidade de terpinoleno foi considerada desprezível. Para essa mistura, a concentração total foi de  $0,95 \text{ g.L}^{-1}$  de piperonal/safrol, na proporção percentual de 89,5:10,5 tanto na fase móvel etanol/água quanto em acetonitrila/água. Por outro lado, a mistura multicomponente foi preparada baseada nos valores da Tabela 3.5, cuja concentração total foi de  $0,95 \text{ g.L}^{-1}$  (solução diluída) e de  $9,50 \text{ g.L}^{-1}$  (solução concentrada) em ambas as fases móveis.

### 3.4.2 Separação em escala semipreparativa

A produção de substâncias em escala semipreparativa ou preparativa envolve a variação nas dimensões do sistema cromatográfico analítico. Vários parâmetros podem ser alterados, visando sempre à reprodutibilidade do cromatograma. Para que os parâmetros cromatográficos ( $k$ ,  $\alpha$ ,  $R_s$ ) sejam reprodutíveis em escala semipreparativa, é mais prático manter altura e a velocidade superficial constantes e variar o raio ( $r$ ) da coluna e a quantidade injetada ( $m_{inj}$ ) da amostra, conforme as Equações (3.1) e (3.2):

$$\frac{Q_1}{A_1} = \frac{Q_2}{A_2} \Rightarrow \frac{Q_1}{\pi r_1^2} = \frac{Q_2}{\pi r_2^2} \Rightarrow \left(\frac{r_2}{r_1}\right)^2 = \frac{Q_2}{Q_1} \quad (3.1)$$

$$\frac{m_{inj2}}{m_{inj1}} = \frac{V_2}{V_1} \Rightarrow \frac{m_{inj2}}{m_{inj1}} = \left(\frac{r_2}{r_1}\right)^2 \quad (3.2)$$

em que  $Q$ ,  $A$ ,  $V$  são a vazão, a área da secção transversal e volume das colunas no modo analítico (1) e semipreparativo (2).

A partir dos cálculos e das informações obtidas no item anterior, foram preparadas cinco soluções cujas concentrações variaram de 0,285-9,50 g.L<sup>-1</sup>, na composição porcentual massa/massa de piperonal/safrol/isosafrol/terpinoleno em fase móvel etanol/água.

### 3.4.3 Procedimentos com injeção empilhada: abordagem experimental

A partir do cromatograma apresentado na Figura 3.2, obteve-se o tempo de ciclo ( $t_{ciclo}$ ) bem como o tempo de coleta ( $t_{co}$ ) das frações ricas em piperonal e safrol, como se segue: marcou-se o tempo inicial ( $t_i$ ) na linha de base antes de começar a surgir o sinal do primeiro componente, já o tempo final ( $t_f$ ) foi marcado após o sinal de o último componente atingir a linha de base. A diferença entre o tempo final e o tempo inicial é o tempo de ciclo. O tempo de coleta da fração de interesse começa no tempo inicial e vai até ao tempo em que o sinal do componente coletado aproxima-se da linha de base, evitando-se sempre coletar próximo ao surgimento do sinal do próximo componente para não ocorrer contaminações.

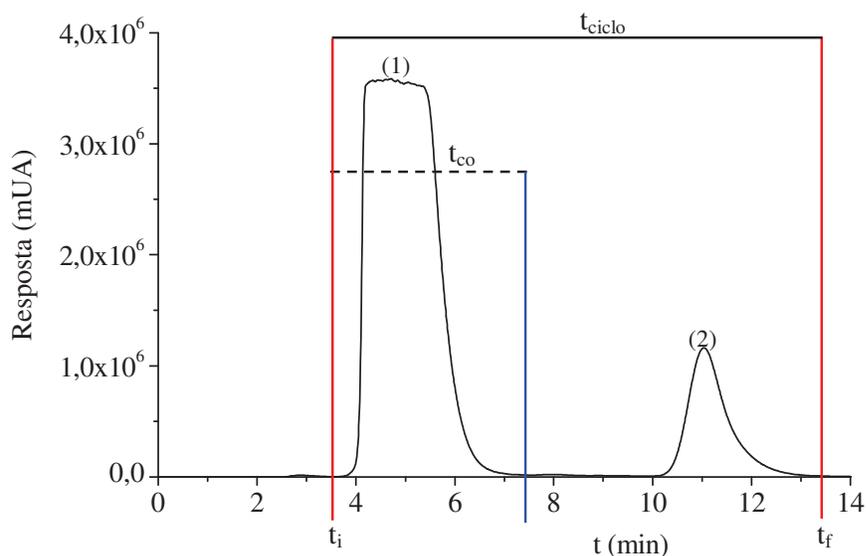


Figura 3.2 – Obtenção do tempo de ciclo ( $t_c$ ) e do tempo de coleta ( $t_{co}$ ). (1) piperonal; (2) safrol. Condições experimentais.  $Q = 3,00 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ;  $V_{\text{injeção}} = 800 \text{ }\mu\text{L}$ ;  $C = 9,50 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  (89,5% de piperonal + 10,5% de safrol); coluna = 25 x 1,0 cm.

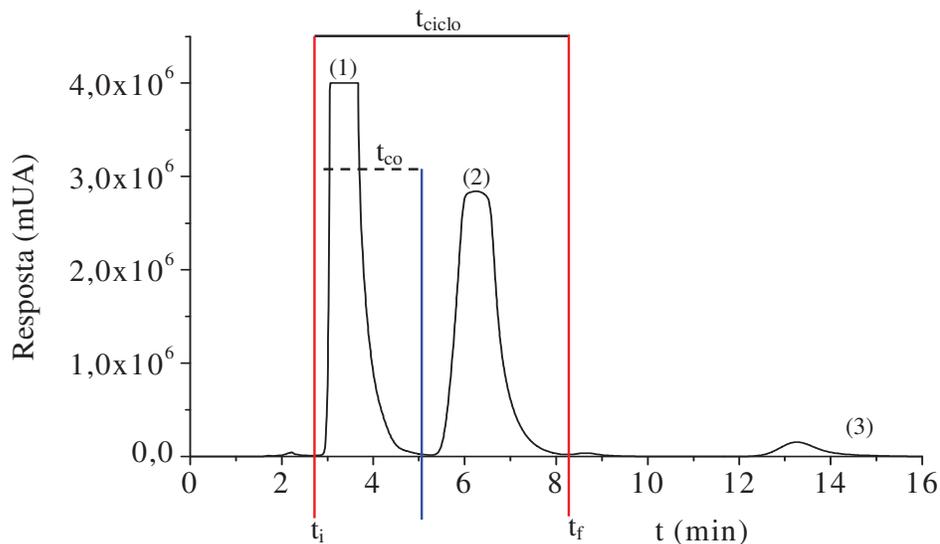


Figura 3.3 - Obtenção do tempo de ciclo ( $t_c$ ) e do tempo de coleta ( $t_{co}$ ). (1) piperonal; (2) safrol e isosafrol; (3) terpinoleno. Condições experimentais.  $Q = 5,0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ;  $V_{\text{injeção}} = 800 \mu\text{L}$ ;  $C = 9,50 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  (89,5% de piperonal + 1,79% de safrol + 7,96% isosafrol + 0,95% de terpinoleno); coluna = 25 x 1,0 cm.

Este procedimento foi empregado para os sistemas acetonitrila/água e etanol/água. Este tipo de análise foi primeiramente aplicado a uma mistura binária (Figura 3.2) para verificar sua funcionalidade. Com esse teste, foi constatado que a técnica é aplicável à mistura multicomponente e, assim, o mesmo procedimento foi realizado para a amostra contendo piperonal, safrol, isosafrol e terpinoleno de que trata esta Tese (Figura 3.3). Cada experimento foi realizado em duplicata para verificar a reprodutibilidade.

De posse do tempo de ciclo e do tempo de coleta foram realizados dois experimentos: o primeiro, com cinco injeções e o segundo com dez injeções. Cada experimento foi repetido para verificar a reprodutibilidade.

Os parâmetros de desempenho pureza, recuperação e produção foram calculados conforme descritos em Guiochon *et al.* (2006).

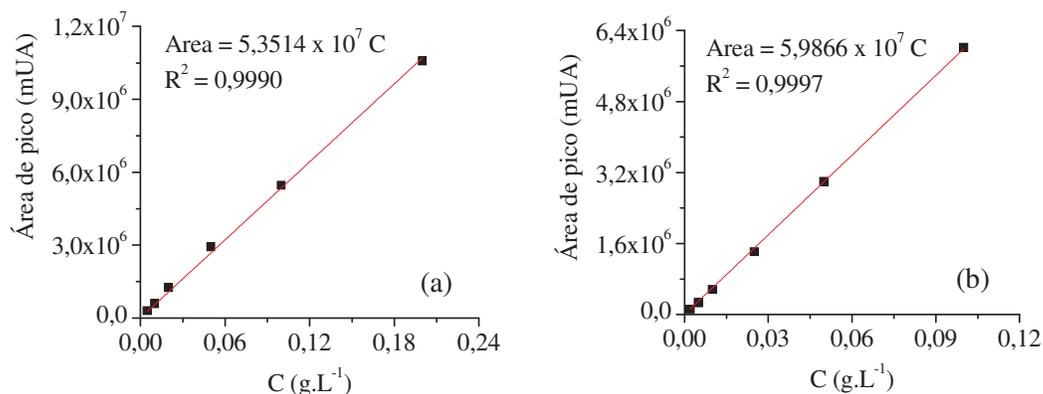
#### 3.4.4 Procedimentos com injeção empilhada: abordagem teórica

O tempo de ciclo e o tempo de coleta dos componentes da solução de síntese foram

calculados pelas Equações (2.18) e (2.19). Para isso, é necessária a obtenção dos parâmetros de transferência de massa e das constantes de equilíbrios. Com esses tempos, foi possível estabelecer uma programação dos eventos de injeção empilhada. A concentração total da solução de trabalho empregada nesses experimentos foi de  $0,190 \text{ g.L}^{-1}$ , conforme a proporção em percentagem massa/massa descrita na Tabela 3.5. Esse valor foi utilizado para garantir a condição de diluição infinita, fazendo com que as bandas cromatográficas sejam tão parecidas quanto possível a uma curva gaussiana. Nessa abordagem, foram realizados experimentos com dez injeções empilhadas nas fases móveis etanol/água e acetonitrila/água a 25 e 35°C. A proporção de cada componente da solução de trabalho segue aquela descrita na Tabela 3.5.

### 3.4.4 Curva de calibração

A partir das injeções empilhadas, coletaram-se duas frações: a primeira, rica em piperonal e a segunda, contendo em safrol, isosafrol e terpinoleno. A determinação da concentração foi feita por meio da curva de calibração de cada componente medida em coluna analítica numa vazão de  $1,0 \text{ mL.min}^{-1}$  com injeções de  $20 \mu\text{L}$  em 245 nm. As temperaturas e as fases móveis das medidas foram as mesmas dos respectivos sistemas de separação. A concentração de cada solução e ajustes lineares (unidade de área por concentração) são apresentados nas Figuras 3.4 – 3.6.



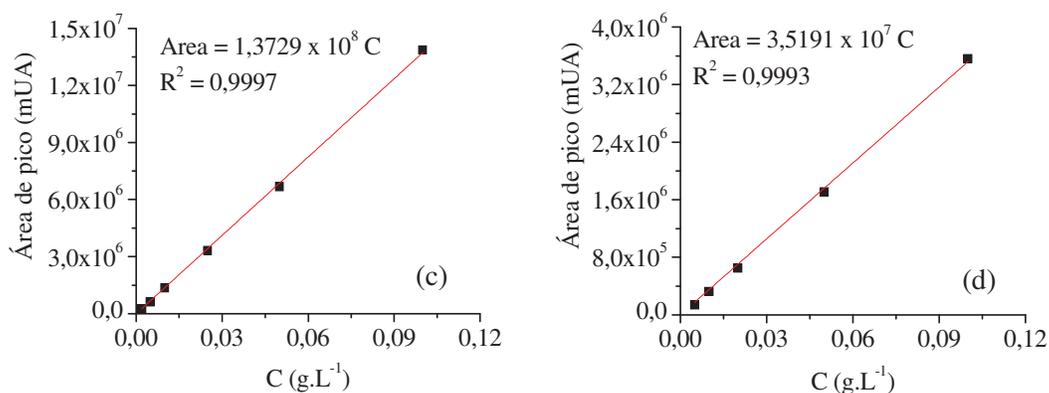


Figura 3.4. Curva de calibração em acetonitrila/água a 25°C: (a) piperonal; (b) safrol; (c) isosafrol e (d) terpinoleno.

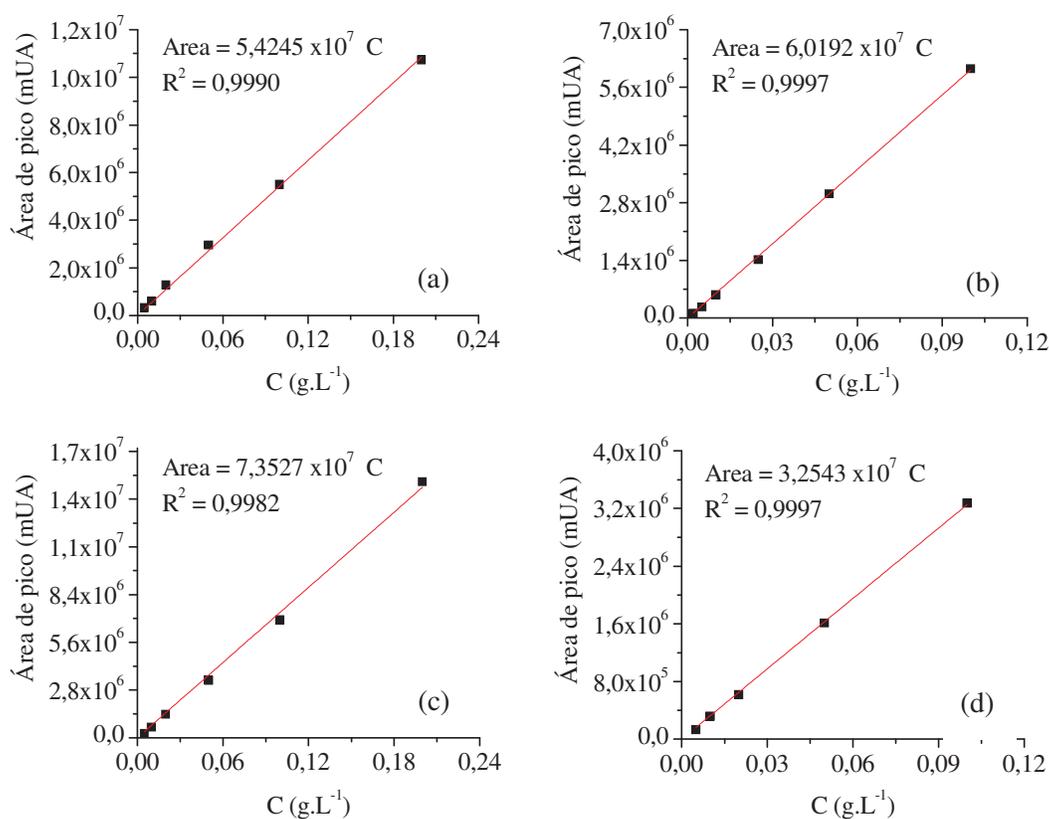


Figura 3.5. Curva de calibração em acetonitrila/água a 35°C: (a) piperonal; (b) safrol; (c) isosafrol e (d) terpinoleno.

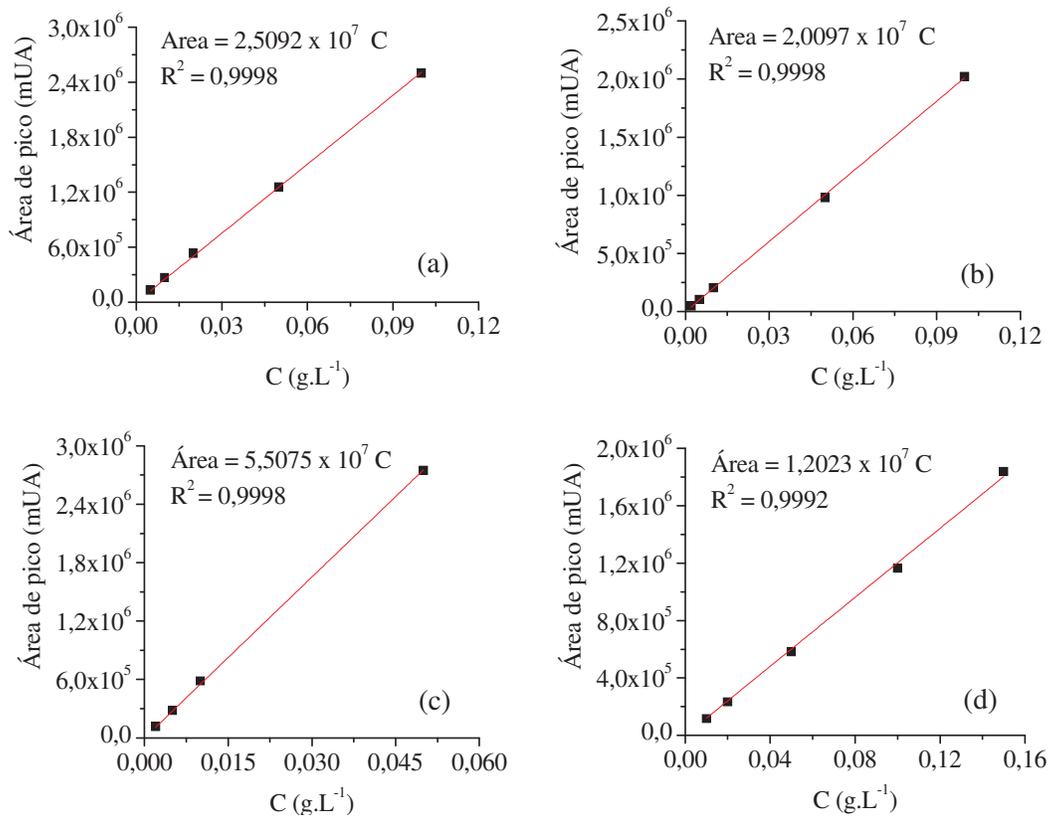


Figura 3.6 Curva de calibração em etanol/água a 35°C: (a) piperonal; (b) safrol; (c) isosafrol e (d) terpinoleno.

# Capítulo 4

## 4. Resultados e Discussão

### 4.1 Caracterização do sistema cromatográfico analítico

A escolha do sistema cromatográfico é um passo fundamental na separação de substâncias. Para isso, os parâmetros cromatográficos  $k$ ,  $\alpha$ ,  $N$  e  $R_s$  são normalmente empregados. Com o auxílio desses parâmetros é possível avaliar o grau de resolução, ampliar escala de separação e aumentar a produção de substâncias puras. No caso desta Tese, uma mistura multicomponente foi injetada, produzindo o cromatograma da Figura 4.1. De posse desse cromatograma, calculou-se os parâmetros cromatográficos pelas Equações (2.11), (2.12), (2.13) e (2.14) e os resultados são apresentados na Tabela 4.1 para dois sistemas de separação de piperonal contido em uma mistura multicomponente. Vale destacar que os parâmetros seletividade ( $\alpha$ ) e Resolução ( $R_s$ ) são sempre calculados considerando a banda cromatográfica mais próxima à banda do componente de interesse, que nesta Tese é o piperonal.

Tabela 4.1 - Parâmetros cromatográficos

Fase móvel - acetonitrila/água 70/30 (v/v)*								
	25°C				35°C			
	$k$	$\alpha$	$N$	$R_s$	$k$	$\alpha$	$N$	$R_s$
<b>piperonal</b>	0,48	-	950,52	-	0,44	-	899,16	-
<b>safrol</b>	1,66	3,43	962,51	4,39	1,52	3,42	862,69	4,01
<b>terpinoleno</b>	5,78	3,48	1028,79	6,93	5 24	3,45	870,33	6,6

\* desvios padrão de todos os valores  $< 10^{-2}$

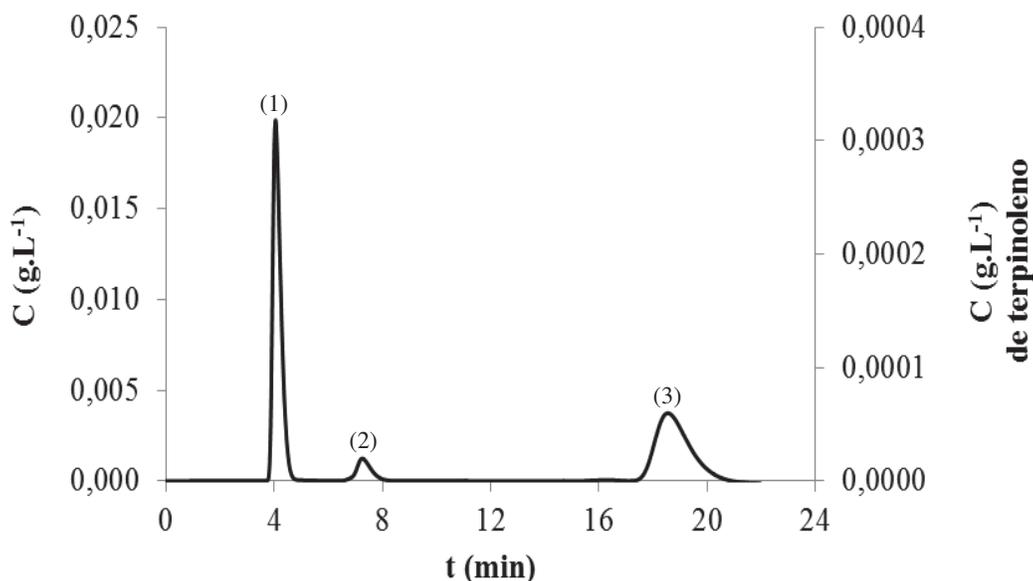


Figura 4.1 – Cromatograma da mistura multicomponente a 25°C contendo (1) piperonal, (2) safrol e isosafrol, (3) terpinoleno cuja concentração foi de 0,571 g.L<sup>-1</sup> na proporção porcentual de 89,3% de piperonal, 1,79% de safrol, 7,96 % isosafrol e 0,95 % de terpinoleno e volume de injeção de 20 µL.

O cromatograma apresentado na Figura 4.1 refere-se à fase móvel acetonitrila/água a 25°C. O eixo esquerdo do gráfico mostra a escala referente ao piperonal, safrol e isosafrol. Já o eixo direito, refere-se ao terpinoleno, que apresentou baixa absorção no comprimento de onda de 245 nm. Os mesmos perfis de banda cromatográfica são obtidos nas fases móveis acetonitrila/água e etanol/água a 35°C, exceto que os tempos de retenção diminuiram para todos os componentes.

Moreira (2013) fez uma varredura para selecionar a melhor fase móvel na separação do piperonal da mesma solução de síntese estudada nesta Tese. A fase estacionária utilizada por Moreira (2013) foi fase a reversa constituída pelo grupo C<sub>18</sub> em coluna analítica (30 x 0,39 cm), porém, com diâmetro de partícula de 10 µm. Segundo o autor, a fase móvel que atende essa exigência é constituída por etanol/água – 70/30 (v/v). Entretanto, a queda de pressão apresentada pela coluna analítica empregada pelo autor foi superior a 150 bar. Isso torna a implementação em escala semipreparativa ou preparativa um tanto crítica devido aos problemas de vazamento e desgaste dos dispositivos de vedação das bombas quando

expostas a altas pressões por longo tempo de operação, o que conduziu a escolha de uma segunda fase móvel composta por acetonitrila/água, na mesma proporção acima. Outra forma de contornar o problema da queda de pressão gerada pela coluna, usando a fase móvel etanol/água foi diminuir a viscosidade pelo aumento da temperatura de 25 para 35°C. Além disso, outra contribuição para diminuição da queda de pressão foi o aumento do diâmetro da partícula, que passou de 10 µm para 20 µm.

Nota-se que o sistema cromatográfico empregado não distingue entre o safrol e o isosafrol (sobreposição de banda), pois os mesmos coeluem (Figura 4.1). Isso se deve ao fato destas substâncias serem isômeros constitucionais e apresentarem estruturas muito parecidas, diminuindo a capacidade de discriminação da fase estacionária (SOLOMONS e FRYHLE, 2012).

Quanto aos resultados relacionados ao fator de retenção ( $k$ ), os valores variaram de 0,44 a 5,78 (Tabela 4.1). Segundo Snyder *et al.* (2010), valores de  $k$  entre 1 e 10 deve ser o objetivo para todas as bandas cromatográficas. Entretanto, agências regulatórias podem recomendar que o valor de  $k$  seja maior que 2 para minimizar possíveis interferências de substâncias não identificadas cujos picos cromatográficos eluem próximo ao tempo morto (FDA, 1994). Como se pode notar da Tabela 4.1, apenas os valores relativos ao piperonal encontram-se fora do intervalo apontado por Snyder *et al.* (2010). Entretanto, em separações cromatográficas, é necessário levar em consideração os resultados dos demais parâmetros para se afirmar que o componente de interesse apresenta separação completa na linha de base.

Considerando a separação do par piperonal/safrol, os valores de  $\alpha$  encontram-se em torno de 3,4. Segundo Lanças (2009), esses resultados mostram que os picos estão bem separados uma vez que valores superiores a 1,0 indicam separação completa na linha de base. Vale ressaltar que a elevação da temperatura de 25 para 35°C não afetou significativamente esse parâmetro.

A eficiência medida em termos do número de pratos teóricos ( $N$ ) para os sistemas da Tabela 4.1 apresentou valores entre 860 e 1028. Alguns autores sugerem 2000 pratos teóricos para que uma coluna seja eficiente (FDA, 1994; DANTUS e WELLS, 2005, ANDRZEJEWSKA *et al.*, 2009). Entretanto, quando os efeitos isotérmicos são dominantes, a eficiência da separação não depende do número de pratos teóricos. Somente separações

com baixa seletividade é que  $N$  deve ser alto para alcançar a resolução desejada (WEWERS *et al.*, 2005).

Quanto à resolução, normalmente, a separação completa na linha de base ocorre com valores maiores que 1,5 para bandas de tamanho similares e iguais a 2,0 para bandas de tamanhos diferentes. Como pode ser observado na Tabela 4.1, todos os valores são maiores do que aqueles apontados na literatura (COLLINS *et al.*, 2006; SNYDER *et al.*, 2007).

## 4.2 Caracterização do leito

### 4.2.1 Determinação da porosidade total

A Equação (2.54) aplicada ao conjunto de dados experimentais de  $t_R$  versus  $L/u_0$  fornece uma reta conforme mostrado no gráfico da Figura 4.2. Os valores das porosidades totais das colunas analítica ( $R^2 = 0,9915$ ) e semipreparativa ( $R^2 = 0,9986$ ) são apresentados na Tabela 4.2. Com a porosidade da partícula fornecida pelo fabricante ( $\epsilon_p = 0,357$ ) e os valores da porosidade total foi possível calcular a porosidade do leito. Essas porosidades são muito importantes nos processos de cálculo das constantes de equilíbrio e dos parâmetros de transferência de massa.

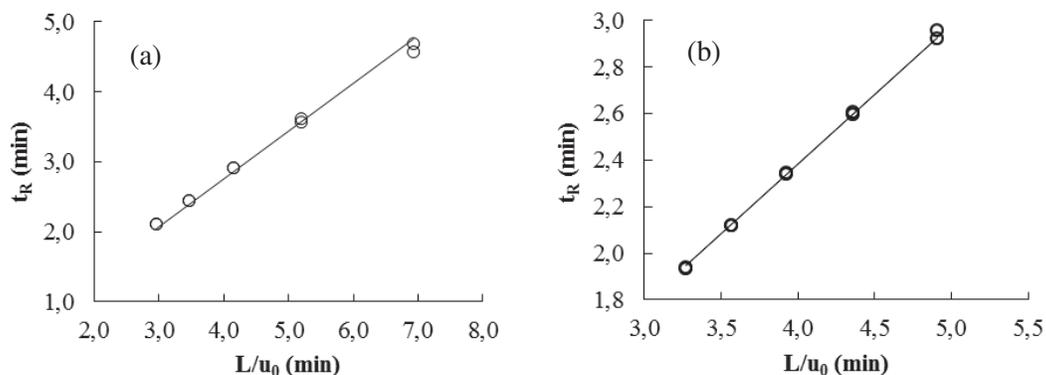


Figura 4.2. Porosidade total: (a) coluna analítica. (b) coluna semipreparativa. Condições experimentais: vazão = 0,6 - 4,0 mL.min<sup>-1</sup>; Temperatura = 25°C; Fase móvel: acetonitrila/água.

Tabela 4.2 - Características dos leitos.

Coluna	L (cm)	DI (cm)	$d_p$ ( $\mu\text{m}$ )	$\epsilon$	$\epsilon_t$
analítica	15,0	0,46	20,0	0,512	0,686
s-preparativa	25,0	1,0	20,0	0,371	0,596

DI: diâmetro interno da coluna;  $d_p$ : diâmetro da partícula.

#### 4.2.2 Queda de pressão

A queda de pressão é um importante parâmetro em cálculos de processos e projetos de plantas industriais de separação cromatográfica, pois pode causar sérios danos aos materiais dos aparelhos de cromatografia e afetar o funcionamento correto dos dispositivos (LUDEMANN-HOMBOURGER *et al.*, 2002; TOUMI *et al.*, 2003; ZABKA *et al.*, 2008; NAM *et al.*, 2011).

A equação de Kozeny-Carman é apropriada para fluxos darcynianos, normalmente encontrados em cromatografia. O parâmetro  $\Phi$  da Equação (2.1) foi obtido experimentalmente a partir da inclinação da reta de  $\Delta P/L$  versus  $u$ , conforme a Figura 4.3.

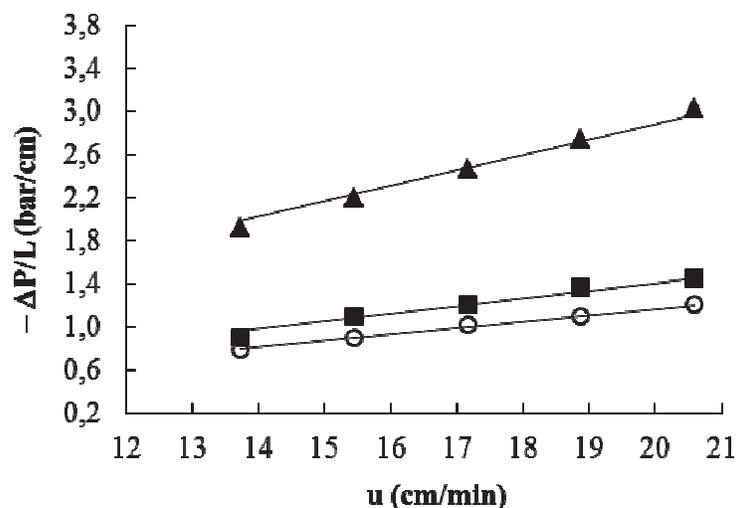


Figura 4.3 – Queda de pressão: fase móvel acetonitrila/água a (○) 25°C e (■) 35°C e fase móvel etanol/água a (▲) 35°C.

As Equações (4.1), (4.2) e (4.3) representam os resultados dos ajustes em relação à fase móvel acetonitrila/água a 25°C ( $R^2 = 0,9933$ ) e 35°C ( $R^2 = 0,9677$ ) e etanol/água a 35°C ( $R^2 = 0,9902$ ), respectivamente (Figura 4.3).

$$-\frac{\Delta P}{L}(\text{bar/cm}) = 0,0586 \cdot u(\text{cm/min}) \quad \text{a } 25^\circ\text{C} \quad (4.1)$$

$$-\frac{\Delta P}{L}(\text{bar/cm}) = 0,0706 \cdot u(\text{cm/min}) \quad \text{a } 35^\circ\text{C} \quad (4.2)$$

$$-\frac{\Delta P}{L}(\text{bar/cm}) = 0,1443 \cdot u(\text{cm/min}) \quad \text{a } 35^\circ\text{C} \quad (4.3)$$

Percebe-se que o valor de  $\Phi$  da Equação (4.3) é duas vezes maior que os valores das Equações (4.1) e (4.2). Este resultado já era esperado, uma vez que a mistura etanol/água produz um dos maiores valores de viscosidade dentre os solventes comumente utilizados em cromatografia líquida em fase reversa, sendo menor apenas que a mistura isopropanol/água (KATTAB *et al.*, 2012; PANG *et al.*, 2007). Normalmente, substitui-se o etanol por acetonitrila para diminuir a viscosidade sem que haja prejuízo considerável nos parâmetros cromatográficos. Em estudo de separação realizado com fase móvel acetonitrila/isopropanol na proporção 25:75 (v/v) à 25°C, a viscosidade foi de 0,751 cP, valor superior à viscosidade da fase móvel contendo acetonitrila usada nesta Tese (SILVA JÚNIOR, 2012). Já Perna (2012), realizando separação com fase móvel orgânica composta por hexano/isopropanol/etanol na proporção 90:5:5 (v/v) e fase estacionária quirál com tamanho de partícula de 20  $\mu\text{m}$  à 25°C encontrou o valor de  $\Phi$  igual a 0,0663, valor bem próximo aquele apresentado pela fase móvel aquosa contendo acetonitrila e fase estacionária reversa de mesmo tamanho de partícula usadas nesta Tese.

### 4.3 Determinação de isoterma

#### 4.3.1 Isoterma linear

As constantes de equilíbrio termodinâmico foram obtidas a partir do primeiro

momento da curva cromatográfica de cada componente na coluna analítica (25 x 0,46 cm) conforme a Equação (2.57). Três sistemas experimentais empregados têm em comum as mesmas proporções de solvente orgânico bem como as mesmas vazões. A seletividade ( $\alpha$ ) foi calculada a partir da Equação (2.3). Os resultados estão apresentados nas Figuras 4.4 – 4.6 e nas Tabelas 4.3 – 4.5.

Tabela 4.3 - Constantes de Equilíbrio em ACN/H<sub>2</sub>O – 25°C

Substância	$k_p$	$\alpha_{j1}$	$R^2$
<b>piperonal (1)</b>	0,869	–	0,99997
<b>safrol (2)</b>	3,122	3,592	0,99998
<b>isosafrol (3)</b>	3,446	3,965	0,99998
<b>terpinoleno (4)</b>	12,343	14,204	0,99992

componente j: 2, 3 ,4.

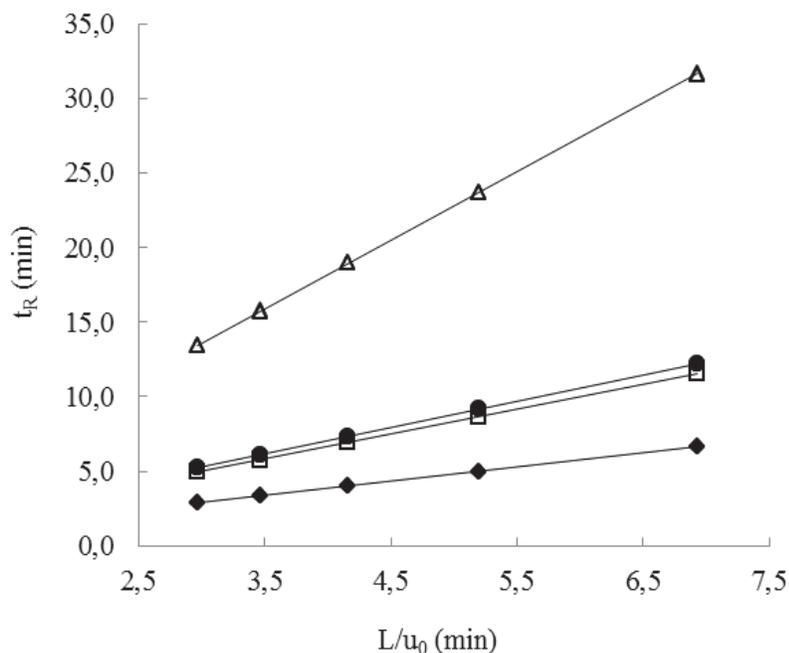


Figura 4.4 - Constantes de equilíbrio: (Δ) terpinoleno, (●) isosafrol, (□) safrol, (◆) piperonal. Condições experimentais: Q = 0,6 - 1,4 mL.min<sup>-1</sup>; Temperatura = 25°C; Fase móvel = acetonitrila/água.

As constantes de equilíbrio mostram que não houve competição entre a espécie química piperonal e os demais componentes da mistura na concentração e nas condições empregadas, visto que os valores de suas constantes são distintos, diferentemente dos valores das constantes do safrol e do isosafrol que são muito próximos. Essas observações são reforçadas pelos valores de seletividade ( $\alpha$ ).

Tabela 4.4 - Constantes de equilíbrio em ACN/H<sub>2</sub>O – 35°C

Substância	$k_p$	$\alpha_{j1}$	$R^2$
<b>piperonal (1)</b>	0,784	–	0,99994
<b>safrol (2)</b>	2,835	3,616	0,99998
<b>isosafrol (3)</b>	3,112	3,969	0,99994
<b>terpinoleno (4)</b>	10,962	13,982	0,99998

componente j: 2, 3, 4.

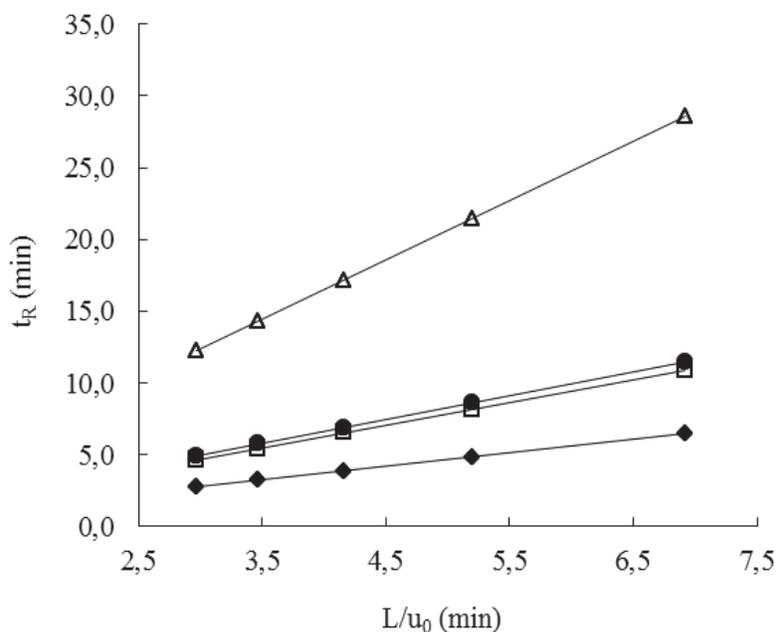


Figura 4.5 - Constantes de equilíbrio: (Δ) terpinoleno, (●) isosafrol, (□) safrol, (◆) piperonal. Condições experimentais:  $Q = 0,6 - 1,4 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ; Temperatura = 35°C; Fase móvel = acetonitrila/água.

Tabela 4.5 - Constantes de Equilíbrio em EtOH/H<sub>2</sub>O – 35°C

Substância	$k_p$	$\alpha_{j1}$	$R^2$
<b>piperonal (1)</b>	0,512	–	0,9997
<b>safrol (2)</b>	2,586	5,051	0,9997
<b>isosafrol (3)</b>	2,923	5,709	0,9996
<b>terpinoleno (4)</b>	8,408	16,422	0,9996

componente j: 2, 3 ,4.

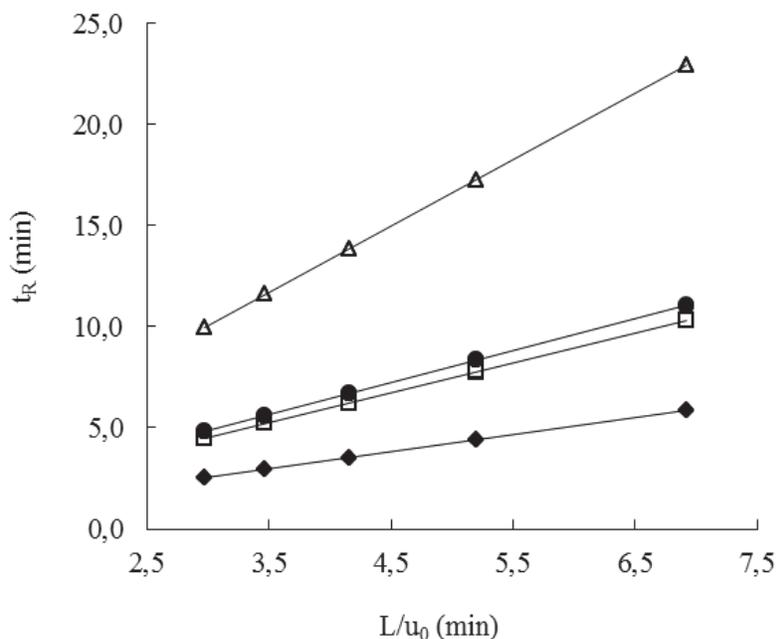


Figura 4.6 - Constantes de equilíbrio: (Δ) terpinoleno, (●) isosafrol, (□) safrol, (◆) piperonal. Condições experimentais:  $Q = 0,6 - 1,4 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ; Temperatura = 35°C; Fase móvel = etanol/água.

Explica-se a proximidade dos valores das constantes de equilíbrio do safrol e do isosafrol, devido as suas moléculas serem isômeros constitucionais, mais precisamente, isômeros de posição (SOLOMONS e FRYHLE, 2012). Nas condições em que a solução de síntese foi estudada, o poder de discriminação da fase estacionária, em relação a estes

isômeros é limitado, sendo, portanto, necessário diminuir a força de interação da fase móvel com soluto, ou seja, aumentar a quantidade do solvente mais polar, no caso a água, para aumentar a seletividade e assim obter valores significativamente diferentes.

As constantes de equilíbrio mostram que a afinidade com a fase estacionária tem a seguinte ordem crescente: piperonal, safrol, isosafrol e terpinoleno. A mesma ordem de afinidade foi encontrada por Moreira (2013) com fase estacionária  $C_{18}$  e fase móvel etanol/água (70/30 - v/v) à 25°C. Observa-se que a diferença entre os valores das constantes do safrol e isosafrol é muito pequena. Por isso, variações pequenas na composição e natureza da fase móvel, também podem provocar uma alteração na ordem de eluição destes componentes.

O terpinoleno apresenta diferença significativa nos valores das constantes obtidas neste trabalho e aquelas encontradas por Moreira (2013). Isso reflete a elevada interação do terpinoleno em relação à fase estacionária  $C_{18}$  mediante a mudança da composição da fase móvel. Enquanto neste trabalho, utilizou-se acetonitrila/água, o referido autor usou etanol/água. As vantagens de se usar a acetonitrila residem nos fatos de ser menos viscosa que o etanol e aumentar a resolução entre o piperonal e os demais componentes.

A fase estacionária  $C_{18}$  mostrou-se bastante seletiva para qualquer combinação entre o piperonal e os demais componentes da mistura, nas condições estudadas. O mesmo não se aplica à separação do par safrol/isosafrol, pois, com o fator de separação ( $\alpha_{32} = 1,01$  a  $1,13$  considerando todos os sistemas) baixo não podem ser separados sob as condições experimentais empregadas (LANÇAS, 2009). Essas substâncias são estruturalmente muito parecidas e por isso, a diferença na interação com a fase estacionária  $C_{18}$  na fase móvel acetonitrila/água e etanol/água foi também, muito pequena.

#### **4.3.2 Isoterma de Langmuir**

Os parâmetros da isoterma foram obtidos pelo método do tempo de retenção binário (TRB) generalizado descrito na seção 2.5, empregando-se a coluna analítica (25 x 0,46 cm). Por este método, são feitas injeções de quantidades elevadas de massa ou de volume, obtendo-se o tempo de retenção das frentes de adsorção pela derivada primeira (ver Apêndice B). A calibração do detector não é necessária como nos métodos comumente utilizados. A fase móvel acetonitrila/água foi usada para obter os parâmetros da isoterma de Langmuir a 25 e 35°C e os resultados estão apresentados na Figura 4.7 e 4.8.

As Equações (4.4) e (4.5) representam os ajustes das isotermas de Langmuir para o piperonal (1) e safrol (2) a 25°C em fase móvel acetonitrila/água.

$$q_1 = \frac{2,319C_1}{1+0,372C_1+0,496C_2} \quad (4.4)$$

$$q_2 = \frac{5,914C_2}{1+0,372C_1+0,496C_2} \quad (4.5)$$

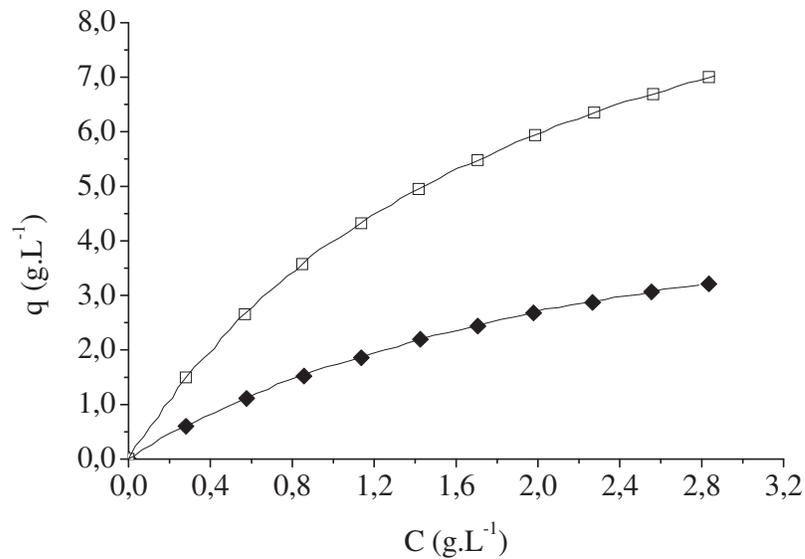


Figura 4.7 - Isotermas de Langmuir para mistura binária (◆) piperonal e (□) safrol em fase estacionária C<sub>18</sub>. Q = 1,0 mL.min<sup>-1</sup>; Temperatura = 25°C; Detecção UV = 250 nm; Fase móvel = acetonitrila/água – 70/30(v/v).

As Equações (4.6) e (4.7) representam os ajustes das isotermas de Langmuir para o piperonal (1) e safrol (2) a 35 °C em fase móvel acetonitrila/água.

$$q_1 = \frac{2,089C_1}{1+0,354C_1+0,415C_2} \quad (4.6)$$

$$q_2 = \frac{5,240 C_2}{1 + 0,354 C_1 + 0,415 C_2} \quad (4.7)$$

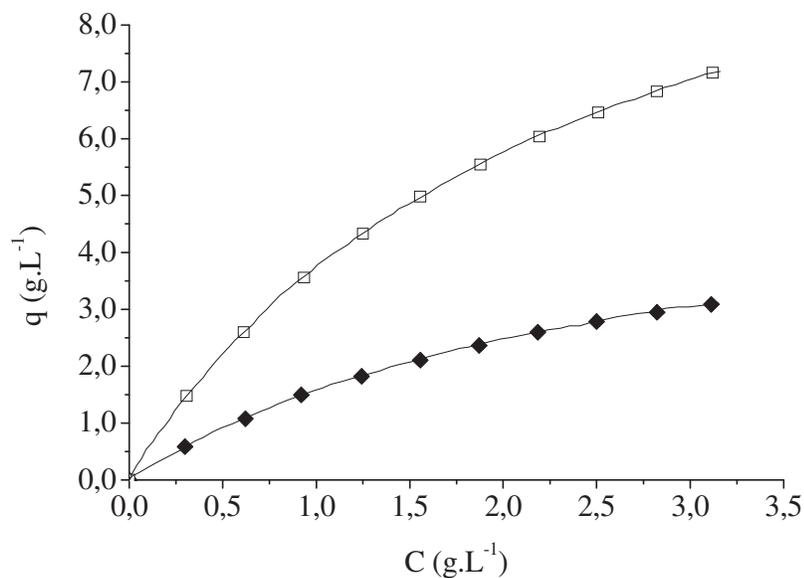


Figura 4.8 - Isoterma de Langmuir para mistura binária (◆) piperonal e (□) safrol em fase estacionária  $C_{18}$ .  $Q = 1,0 \text{ mL.min}^{-1}$ ; Temperatura =  $35^{\circ}\text{C}$ ; Detecção UV = 250 nm; Fase móvel = acetonitrila/água – 70/30(v/v).

Por outro lado, a fase móvel etanol/água foi testada a  $35^{\circ}\text{C}$  e os resultados são mostrados na Figura 4.9. As Equações (4.8) e (4.9) representam as isotermas de Langmuir para o piperonal (1) e safrol (2) a  $35^{\circ}\text{C}$ .

$$q_1 = \frac{1,861 C_1}{1 + 0,288 C_1 + 0,348 C_2} \quad (4.8)$$

$$q_2 = \frac{4,193 C_2}{1 + 0,288 C_1 + 0,348 C_2} \quad (4.9)$$

Conforme o método do tempo de retenção proposto por Rajendran e Chen (2009), a saturação da fase estacionária é observada quando ocorre, no cromatograma, o toque de banda (ou sobreposição de bandas). Este fenômeno foi observado na concentração de  $20 \text{ g.L}^{-1}$  cuja proporção piperonal/safrol foi de 50%, ou seja,  $10 \text{ g.L}^{-1}$  de cada componente.

Neste estudo, a capacidade de saturação ( $q_s$ ) (obtida do ajuste da Equação 2.5) da fase estacionária em relação ao piperonal/safrol foi de 6,22 e 11,91  $\text{g.L}^{-1}$  à 25°C, de 5,90 e 12,64  $\text{g.L}^{-1}$  à 35°C em acetonitrila/água e, 6,46 e 12,06  $\text{g.L}^{-1}$  à 35°C em etanol/água. A capacidade de saturação é um dos parâmetros necessários para o cálculo do fator de carga dado pela Equação (2.59). Com este fator, pureza e recuperação definidos é possível projetar a quantidade de amostra que poderá ser injetada no sistema cromatográfico e, conseqüentemente, prever a concentração a ser usada na solução de trabalho (GOLSHAN-SHIRAZI e GUIOCHON, 1989; GUIOCHON *et al.*, 2006). Por exemplo, tomando-se as Equações 2.58 – 2.61 (ver Tabela 2.3, Seção 2.12) e considerando uma pureza de 98%, recuperação de 97% e volume de injeção de 800  $\mu\text{L}$ , a concentração máxima de piperonal na solução de trabalho deverá ser cerca de 9,46  $\text{g.L}^{-1}$ . Em relação ao safrol, considerando as mesmas condições, esse valor será de 4,94  $\text{g.L}^{-1}$ . Essa análise foi aplicada ao sistema acetonitrila/água à 25°C. Esses resultados foram extremamente importantes na definição da concentração da solução de trabalho empregada na abordagem experimental.

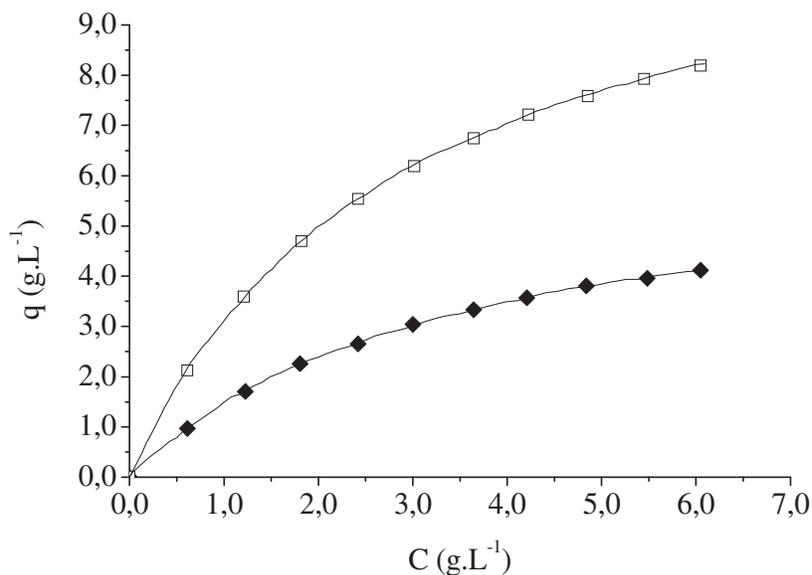


Figura 4.9 - Isoterma de Langmuir para mistura binária (◆) piperonal e (□) safrol em fase estacionária  $C_{18}$ .  $Q = 1,0 \text{ mL.min}^{-1}$ ; Temperatura = 35°C; Detecção UV = 250 nm; Fase móvel = etanol/água – 70/30 (v/v).

A determinação dos parâmetros da isoterma de Langmuir não foi feita para o terpinoleno devido sua concentração na mistura utilizada ser baixa e, principalmente, por sua banda cromatográfica se encontrar muito distante da banda do piperonal, conforme

mostrado pelo fator de separação da Tabela 4.1, tornando a possibilidade de sobreposição de banda extremamente difícil, que é um pré-requisito para a aplicação do método do tempo de retenção binário.

#### 4.4 Determinação dos coeficientes de dispersão axial e de transferência de massa

Os parâmetros de transferência de massa foram obtidos a partir do segundo momento da curva cromatográfica do piperonal, safrol, isosafrol e terpinoleno em coluna semipreparativa (25 x 1,0 cm). A inclinação da reta dada pela Equação (2.49) forneceu o coeficiente de difusão efetivo ( $D_{ef}$ ) e a intersecção como o eixo, o coeficiente de dispersão axial. Os resultados são apresentados no gráfico (Van Deemter modificado) das Figuras 4.10 – 4.12 e nas Tabelas 4.7 – 4.9. O coeficiente de determinação ( $R^2$ ) para cada sistema experimental encontra-se na Tabela 4.6. Em todas as figuras, observa-se uma relação linear entre  $HETP_{mod}$  versus  $u$  para cada componente.

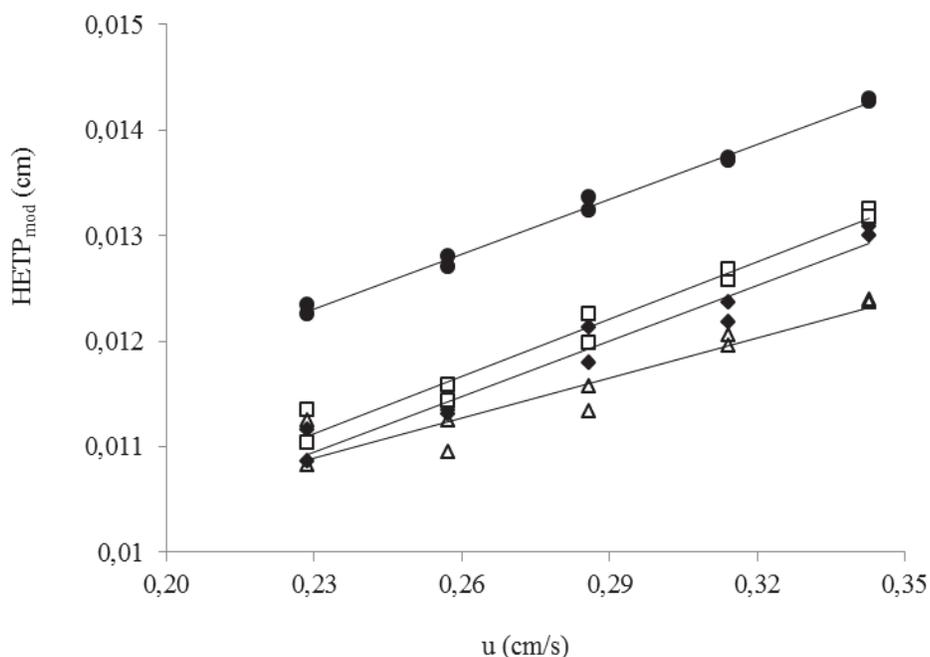


Figura 4.10 - Obtenção dos parâmetros de transferência de massa: (●) isosafrol, (□) safrol (◆) piperonal, (Δ) terpinoleno. Condições experimentais:  $Q = 4,0 - 6,0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ; Fase móvel = acetonitrila/água; Temperatura =  $25^{\circ}\text{C}$ ; Coluna =  $25 \times 1,0 \text{ cm}$ .

Tabela 4.6 – Coeficiente de determinação ( $R^2$ )

	ACN/H <sub>2</sub> O Temperatura = 25°C	ACN/H <sub>2</sub> O Temperatura = 35°C	EtOH/H <sub>2</sub> O Temperatura = 35°C
Piperonal	0,9553	0,9873	0,9857
Safrol	0,9719	0,9739	0,9845
Isosafrol	0,9949	0,9585	0,8950
Terpinoleno	0,8937	0,9894	0,8912

Tabela 4.7 – Parâmetros de transferência de massa em ACN/H<sub>2</sub>O – 25°C

Substância	$D_p$ (cm <sup>2</sup> .s <sup>-1</sup> )	$D_{ef}$ (cm <sup>2</sup> .s <sup>-1</sup> )	$D_s$ (cm <sup>2</sup> .s <sup>-1</sup> )	$E_b$ (cm <sup>2</sup> .s <sup>-1</sup> )
<b>piperonal (1)</b>	$2,150 \times 10^{-6}$	$1,655 \times 10^{-6}$	$1,588 \times 10^{-6}$	$3,450 \times 10^{-3}u$
<b>safrol (2)</b>	$1,787 \times 10^{-6}$	$2,791 \times 10^{-6}$	$1,072 \times 10^{-6}$	$3,485 \times 10^{-3}u$
<b>isosafrol (3)</b>	$1,633 \times 10^{-6}$	$3,005 \times 10^{-6}$	$1,093 \times 10^{-6}$	$4,159 \times 10^{-3}u$
<b>terpinoleno (4)</b>	$1,293 \times 10^{-6}$	$5,466 \times 10^{-6}$	$6,306 \times 10^{-7}$	$4,004 \times 10^{-3}u$

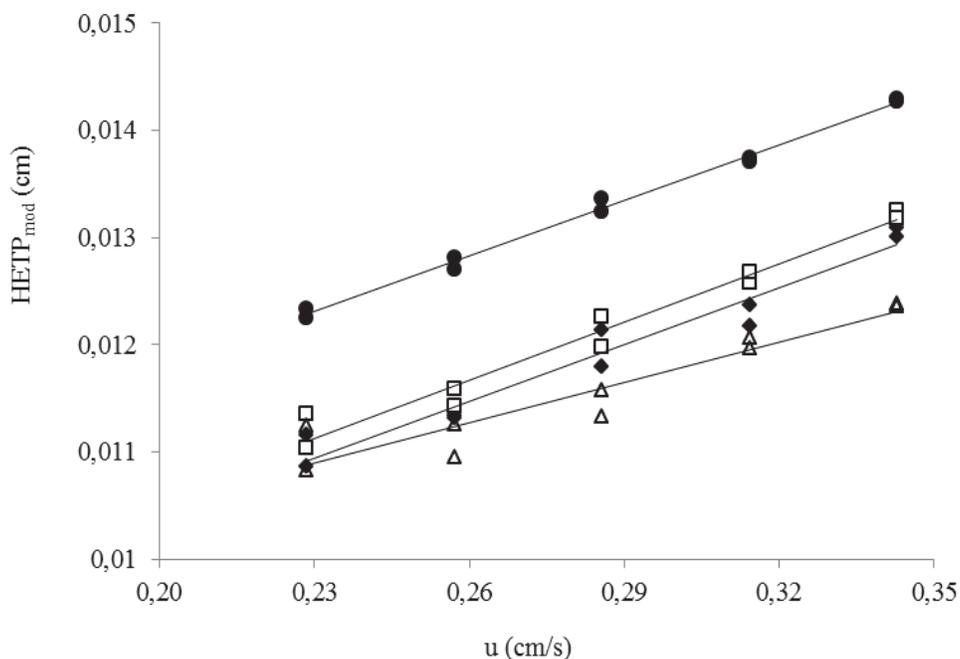


Figura 4.11 – Obtenção dos parâmetros de transferência de massa: (●) isosafrol, (□) safrol (◆) piperonal, (Δ) terpinoleno. Condições experimentais:  $Q = 4,0 - 6,0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ; Fase móvel = acetonitrila/água; Temperatura = 35°C; Coluna = 25 x 1,0 cm.

Tabela 4.8 - Parâmetros de transferência de massa em ACN/H<sub>2</sub>O – 35°C

Substância	$D_p$ (cm <sup>2</sup> .s <sup>-1</sup> )	$D_{ef}$ (cm <sup>2</sup> .s <sup>-1</sup> )	$D_s$ (cm <sup>2</sup> .s <sup>-1</sup> )	$E_b$ (cm <sup>2</sup> .s <sup>-1</sup> u)
<b>piperonal (1)</b>	$2,653 \times 10^{-6}$	$1,542 \times 10^{-6}$	$1,180 \times 10^{-6}$	$2,920 \times 10^{-3}u$
<b>safrol (2)</b>	$2,205 \times 10^{-6}$	$3,185 \times 10^{-6}$	$1,316 \times 10^{-6}$	$3,188 \times 10^{-3}u$
<b>isosafrol (3)</b>	$2,015 \times 10^{-6}$	$3,548 \times 10^{-6}$	$1,413 \times 10^{-6}$	$3,564 \times 10^{-3}u$
<b>terpinoleno (4)</b>	$1,595 \times 10^{-6}$	$6,449 \times 10^{-6}$	$8,341 \times 10^{-7}$	$4,233 \times 10^{-3}u$

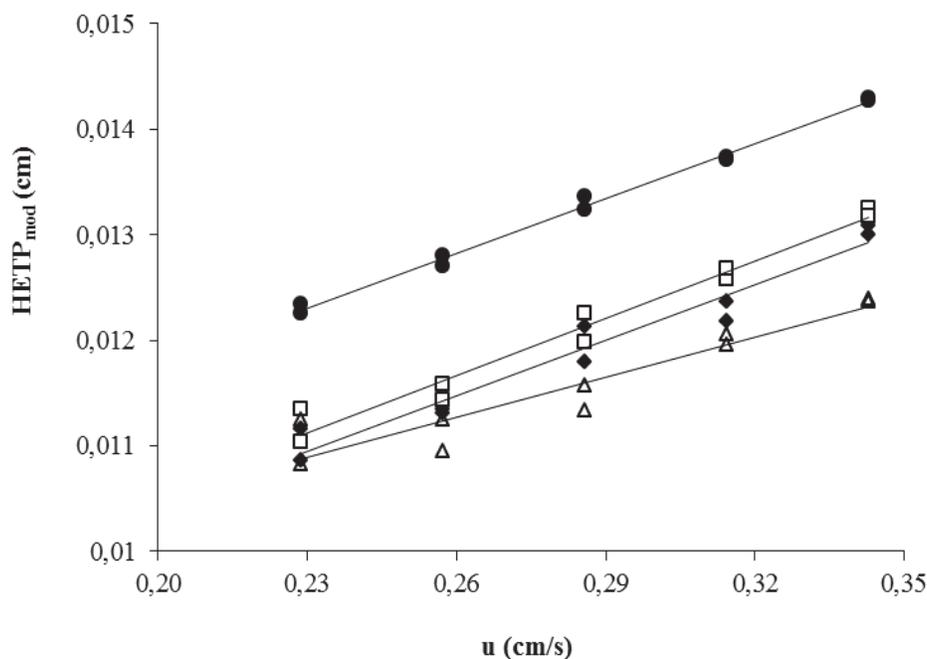


Figura 4.12 - Obtenção dos parâmetros de transferência de massa: (●) isosafrol, (□) safrol (◆) piperonal, (Δ) terpinoleno. Condições experimentais: Q = 4,0 – 6,0 mL.min<sup>-1</sup>; Fase móvel = etanol/água; Temperatura = 35°C; Coluan = 25 x 1,0 cm.

Tabela 4.9 - Parâmetros de transferência de massa em EtOH/H<sub>2</sub>O – 35°C

Substância	$D_p$ (cm <sup>2</sup> .s <sup>-1</sup> )	$D_{ef}$ (cm <sup>2</sup> .s <sup>-1</sup> )	$D_s$ (cm <sup>2</sup> .s <sup>-1</sup> )	$E_b$ (cm <sup>2</sup> .s <sup>-1</sup> u)
<b>piperonal (1)</b>	$9,550 \times 10^{-7}$	$5,927 \times 10^{-6}$	$7,641 \times 10^{-7}$	$3,808 \times 10^{-3}u$
<b>safrol (2)</b>	$7,939 \times 10^{-7}$	$1,325 \times 10^{-6}$	$6,261 \times 10^{-7}$	$4,002 \times 10^{-3}u$
<b>isosafrol (3)</b>	$7,255 \times 10^{-7}$	$1,941 \times 10^{-6}$	$8,947 \times 10^{-7}$	$6,522 \times 10^{-3}u$
<b>terpinoleno (4)</b>	$5,743 \times 10^{-7}$	$2,633 \times 10^{-6}$	$4,491 \times 10^{-7}$	$5,653 \times 10^{-3}u$

Vale ressaltar que de posse do valor de  $D_{ef}$ , obtido experimentalmente, o coeficiente de difusão superficial ( $D_s$ ) bem como o coeficiente de difusão nos poros ( $D_p$ ) foram calculados conforme as Equações (2.34) e (2.37), respectivamente (ver Tabela 4.7 – 4.9).

Os resultados mostram (Tabela 4.7 – 4.9) que o mecanismo que descreve a difusão efetiva tem uma contribuição relativamente grande da difusão superficial. Isto é evidenciado pela razão entre  $D_p/D_s$  ser menor que 2, indicando a pronunciada influência deste mecanismo. Vários estudos sobre transferência de massa em fase reversa, especialmente  $C_{18}$ , tem estabelecido a importância da difusão superficial para a difusão efetiva nos poros. Em alguns casos, a difusão superficial tornou-se o principal mecanismo de transporte de massa. Atualmente, a maioria dos modelos de balanço de massa diferencial para difusão nos poros leva em consideração a difusão superficial, somando-se seu valor ao termo da difusão na Equação (2.23) (MIYABE e GUIOCHON, 1999; PIATKOWSKI *et al.*, 2003; HONG *et al.*, 2004; MIYABE, 2009; MIYABE e GUIOCHON, 2010). Outro fato observado é que nas equações de balanço de massa do modelo, primeiramente, considerou-se apenas o mecanismo de difusão nos poros descrito por  $D_p$  como explicação à difusão dos solutos. Porém, o modelo não se ajustou aos dados uma vez que os coeficientes encontrados não tinham significados físicos, foi, portanto necessário incluir no modelo, as contribuições da difusão superficial traduzidas por  $D_s$ .

Para se verificar a magnitude da influência da resistência externa ou interna sobre o fenômeno de transferência de massa, tomou-se o Número de Biot mássico ( $Bi_m$ ) dado pela Equação (4.10) (BAILEY e OLLIS, 1986; CREMASCO, 2002; ZHOU *et al.* 2003):

$$Bi_m = \frac{k_f d_p}{2D_{ef}} \quad (4.10)$$

em que  $d_p$  é o diâmetro da partícula,  $k_f$  é o coeficiente de transferência de massa no filme e  $D_{ef}$  é coeficiente de difusão efetivo. Os valores de  $k_f$  foram calculados conforme correlação de Wilson e Geankoplis (1966) (Equação (2.35)) e os valores de  $D_{ef}$ , encontram-se nas Tabelas 4.7 – 4.9 para os três sistemas de separação em estudo, dos quais se tomaram o menor e o maior valor de  $k_f$  e  $D_{ef}$  para calcular o Número de Biot mássico. Como se pode notar na Equação (4.10), o numerador está relacionado à transferência de massa externa descrita por  $k_f$  e o denominador está relacionado à transferência de massa no interior das

partículas traduzida por  $D_{ef}$ . O resultado dos valores do número de Biot são apresentados na Tabela 4.10.

Tabela 4.10 – Característica da transferência de massa global

	$k_f \times 10^{-2}(\text{cm/s})$	$Bi_M$
	Min. – Max.	Min. – Max.
Piperonal	3,036 – 6,866	31,5 – 58,6
Safrol	2,684 – 6,070	16,5 – 23,2
Isosafrol	2,527 – 5,717	13,0 – 16,5
Terpinoleno	2,163 – 4,253	6,63 – 9,40

Há três casos do uso deste número:  $Bi_m < 0,1$ ;  $0,1 < Bi_m < 100$  e  $Bi_m > 100$ . O caso em  $Bi_m < 0,1$  indica que a resistência externa controla a transferência de massa global. O caso em que  $0,1 < Bi_m < 100$  indica que tanto a resistência interna quanto a resistência externa são efeitos contribuem para transferência de massa. O caso em que  $Bi_m > 100$  significa que a resistência interna é o efeito que controla a transferência de massa global (BAILEY e OLLIS, 1986; PARTIR, 1994; DINCER, 1998; SARTI *et al.* 2001). Conforme a Tabela 4.10, os valores do Número de Biot encontram-se dentro do segundo intervalo apontado pelos autores, ou seja, tanto a resistência interna quanto a resistência externa são efeitos que influenciam a transferência de massa.

No que se refere à obtenção da dispersão axial, verificou-se, para todas as espécies químicas avaliadas, valores na ordem de  $10^{-3} \text{ cm}^2.\text{s}^{-1}$ . Há, na literatura, várias correlações para a estimativa de tais valores. Assim sendo, os valores experimentais obtidos no presente trabalho foram comparados com aqueles advindos das correlações de Chun e Wen (1968), Koch e Brady (1985), Gunn (1987) e Athalye *et al.* (1992). A equação de cada uma dessas correlações está descrita na Tabela 2.2. O coeficiente de dispersão axial teórico foi calculado baseado nas seguintes condições: acetonitrila/água à 25°C, acetonitrila/água à 35°C e etanol/água à 35°C cuja a vazão variou de 4,0 – 6,0 mL.min<sup>-1</sup>. A comparação foi feita baseada nos desvios relativos médios (DRM), conforme a Equação 4.11. Os resultados do desempenho de cada correlação para cada condição acima descrita são apresentados nas Tabelas 4.11 – 4.13.

$$\text{DRM} = \left( \frac{E_{b\text{teórico}} - E_{b\text{experimental}}}{E_{b\text{experimental}}} \right) \times 100\% \quad (4.11)$$

Tabela 4.11 - Desvios relativos médios em percentagem ACN/H<sub>2</sub>O – 25°C

Componente	Athalye	Chung e Wen	Gunn	Koch e Brady
<b>Piperonal</b>	-4,02	6,57	-67,57	-9,98
<b>Safrol</b>	-2,01	5,51	-62,94	-8,17
<b>Isosafrol</b>	-16,65	-11,60	-66,73	-58,92
<b>Terpinoleno</b>	-9,98	-8,17	-58,92	-26,37

Observa-se que para cada condição mencionada acima, as correlações de Chun e Wen (1968) e Athalye *et al.* (1992) são as correlações que mostram os menores desvios, indicando que descrevem melhor a dispersão axial no interior das colunas. Por outro lado, a correlação de Gunn (1987) mostra os maiores desvios. Hong *et al.*, (2004), destacou que essa correlação apresenta erros elevados para baixos valores do Número de Reynolds como é o caso de separações cromatográficas. Nesta Tese, os Números de Reynolds variaram de  $1,1 \times 10^{-2}$  a  $4,2 \times 10^{-2}$  considerando-se todos os sistemas. Esses valores são semelhantes aos encontrados por Hong *et al.*, (2004). Por isso, a correlação de Gunn (1987) não é recomendada para ser empregada em cálculos de coeficiente de dispersão axial das substâncias analisadas neste trabalho, utilizando as fases móveis (acetonitrila/água, etanol/água) aqui apresentadas bem como a fase estacionária C<sub>18</sub>.

Tabela 4.12 - Desvios relativos médios em percentagem ACN/H<sub>2</sub>O – 35°C

Componente	Athalye	Chung e Wen	Gunn	Koch e Brady
<b>Piperonal</b>	9,51	25,82	-67,51	-16,68
<b>Safrol</b>	3,44	15,24	-65,60	-19,61
<b>Isosafrol</b>	-6,08	3,08	-66,98	-26,30
<b>Terpinoleno</b>	-17,79	-13,22	-66,73	-33,98

Por último, a correlação de Koch e Brady também não deve ser empregada em estimativas de coeficiente de dispersão axial, uma vez que seus desvios foram bastante elevados, considerando um limite razoável.

Apesar da correlação de Chung e Wen (1968) apresentar bom acordo com os coeficientes de dispersão axial experimentais, a correlação de Athalye *et al.* (1992) é a mais

indicada para efeito de cálculo teórico do coeficiente de dispersão axial uma vez que seus valores de desvios foram, em geral, menores que de Chung e Wen (1968).

Tabela 4.13 - Desvios relativos médios em percentagem EtOH/H<sub>2</sub>O – 35°C

Componente	Athalye	Chung e Wen	Gunn	Koch e Brady
Piperonal	-0,46	-3,15	-46,92	-16,72
Safrol	-2,32	-7,84	-43,40	-17,32
Isosafrol	-39,16	-43,45	-63,43	-48,23
Terpinoleno	-27,01	-34,75	-52,30	-37,17

#### 4.5 Separação cromatográfica por injeção empilhada: abordagem experimental

A partir da caracterização do sistema cromatográfico analítico, foi feita uma análise para obtenção dos parâmetros de ampliação de escala na coluna analítica, conforme mostra a Figura 4.13. Essa abordagem foi empregada para soluções concentradas da mistura dos componentes conforme os valores descritos na Tabela 3.5, na seção 3.4, do Capítulo de Materiais e Métodos.

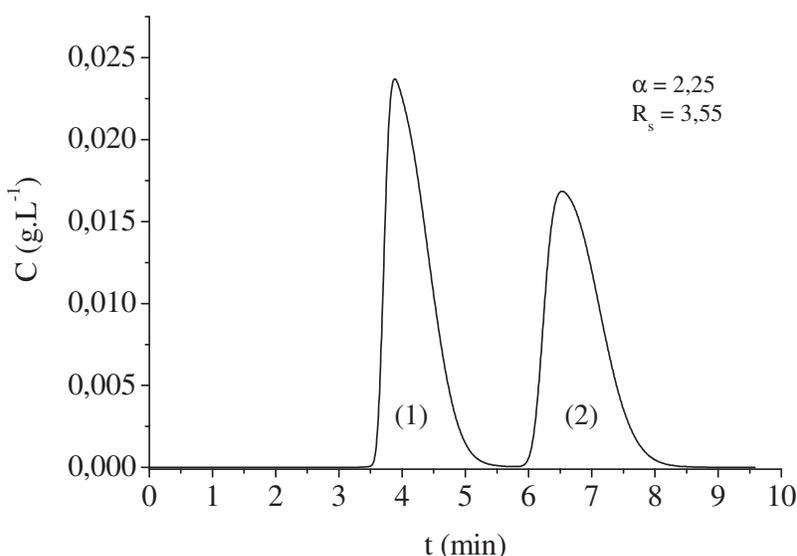


Figura 4.13 – Cromatograma da mistura pseudo-binária piperonal(1)/safrol(2): Q = 1,0 mL.min<sup>-1</sup>; Temperatura = 35°C; Pressão = 84 kgf.cm<sup>-2</sup>; V<sub>injeção</sub> = 50 µL; Detecção UV = 245 nm; Coluna = 25 x 0,46 cm; C = 0,950 g.L<sup>-1</sup> (89,5% de piperonal + 10,5% de safrol).

Para manter as mesmas condições de seletividade ( $\alpha$ ) e resolução ( $R_s$ ) apresentadas na Figura 4.13, a vazão calculada foi de  $4,756 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$  e a concentração, de  $0,30 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  (Equação 3.1 e 3.2). Entretanto, essa quantidade de massa injetada seria muito pequena. Para se aumentar essa massa, mediante o uso de soluções mais concentradas sem que ocorra diminuição na pureza, diminuiu-se a vazão para  $3,0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ .

Essa alteração operacional diminuiu a queda de pressão de 169 para  $84 \text{ kgf}\cdot\text{cm}^{-2}$ , tornando o manuseio do sistema menos crítico e possibilitando a injeção de quantidades maiores de massa. Para escolher a massa a ser injetada, fez-se uma curva de concentração até um máximo que se poderia conseguir, obtendo linha de base ou até haver o “toque de banda”, ou seja, até ocorrer a sobreposição das bandas (ver Figura 4.14). Essa curva foi construída da seguinte maneira: tomou-se a quantidade máxima separável na linha de base obtida na ampliação da escala ( $0,285 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ), dobrou-se esse valor e em seguida estabeleceu-se valores de concentração até  $9,50 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ , como mostra a Figura 4.14. Procedimento análogo foi adotado por Zongde *et al.* (2005) na resolução de mistura binária, obtendo resultados semelhantes aos encontrados neste trabalho.

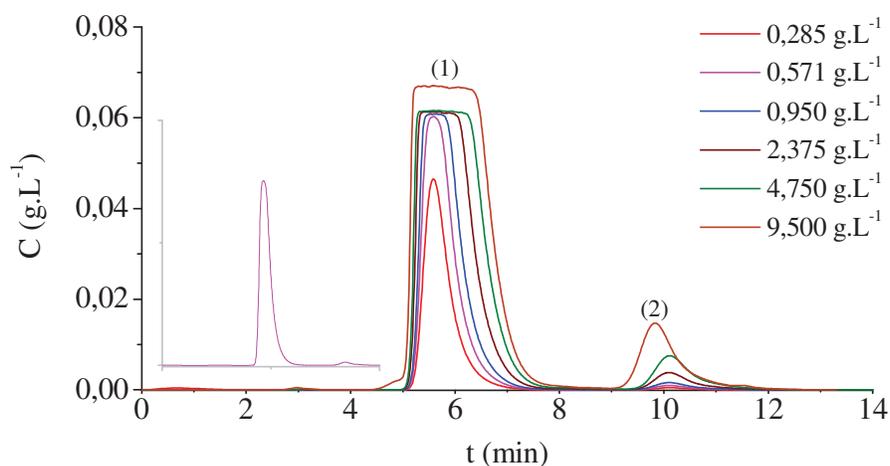


Figura 4.14 - Aumento da concentração dos componentes da mistura (1) piperonal/ (2) safrol. Condições experimentais:  $Q = 3,00 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ; Temperatura =  $35^\circ\text{C}$ ; Pressão =  $33 \text{ kgf}\cdot\text{cm}^{-2}$ ;  $V_{\text{injeção}} = 800 \mu\text{L}$ ; Detecção UV =  $260 \text{ nm}$ ; Coluna =  $25 \times 1,0 \text{ cm}$ .

Observa-se, na Figura 4.14, que uma resolução completa na linha de base é alcançada até a concentração de  $0,571 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ . Apesar dessa concentração levar à pureza máxima de piperonal, produção muito maior dessa substância poder ser atingida com uma

pureza igual ou superior a 98% com uma solução na concentração em torno de  $9,50 \text{ g.L}^{-1}$ , como mostrado pelo exemplo da seção 4.3.2, na qual se utilizam os parâmetros da isoterma de Langmuir associados a uma pureza e recuperação estabelecidas para definir a concentração da amostra a ser injetada.

#### 4.5.1 Separação de piperonal em escala semipreparativa

Os resultados em relação à separação por injeção empilhada em fase móvel acetonitrila/água à 25 e à 35°C são apresentados nas Tabelas 4.14 – 4.15 e Figuras 4.15 – 4.16. A pureza (Pu), a recuperação (Y), produção (Pr), consumo de solvente (CS) e produtividade específica (SP) foram calculados conforme as Equações descritas na Tabela 2.3.

Tabela 4.14 - Parâmetros de desempenho à 25°C

Acetonitrila/água - 70:30 (v/v)					
Injeções	Pu (%)	Y (%)	Pr ( $\text{mg.min}^{-1}$ )	CS ( $\text{mL.mg}^{-1}$ )	SP ( $\text{mg.mL}^{-1}$ )
5	98,66	97,29	0,64	15,44	0,065
5	98,66	97,29	0,64	15,44	0,065
10	98,67	98,42	1,08	9,10	0,110
10	98,67	98,42	1,08	9,10	0,110

**Pu:** pureza; **Y:** recuperação; **Pr:** produção; **CS:** consumo de solvente; **SP:** produção específica.

Tabela 4.15 - Parâmetros de desempenho à 35°C.

Acetonitrila/água -70:30 (v/v)					
Injeções	Pu (%)	Y (%)	Pr ( $\text{mg.min}^{-1}$ )	CS ( $\text{mL.mg}^{-1}$ )	SP ( $\text{mg.mL}^{-1}$ )
5	98,66	97,65	0,84	11,68	0,086
5	98,66	97,69	0,84	11,68	0,086
10	98,49	98,16	0,97	10,15	0,099
10	98,41	98,15	0,97	10,16	0,098

Os valores de pureza (Pu) não variaram em relação à quantidade injetada, diferentemente da recuperação (Y) que apresentou perda maior em relação ao menor número de injeções e o consumo de solvente (CS) que foi menor em relação à maior quantidade injetada. Já a produção (Pr) e a produtividade específica (SP) para dez injeções empilhadas foi o dobro dos valores relacionados a cinco injeções empilhadas. Isto mostra que é possível aumentar a produção de piperonal nas condições cromatográficas e instrumentais empregadas sem que haja perda significativa na pureza para faixa de concentração estudada.

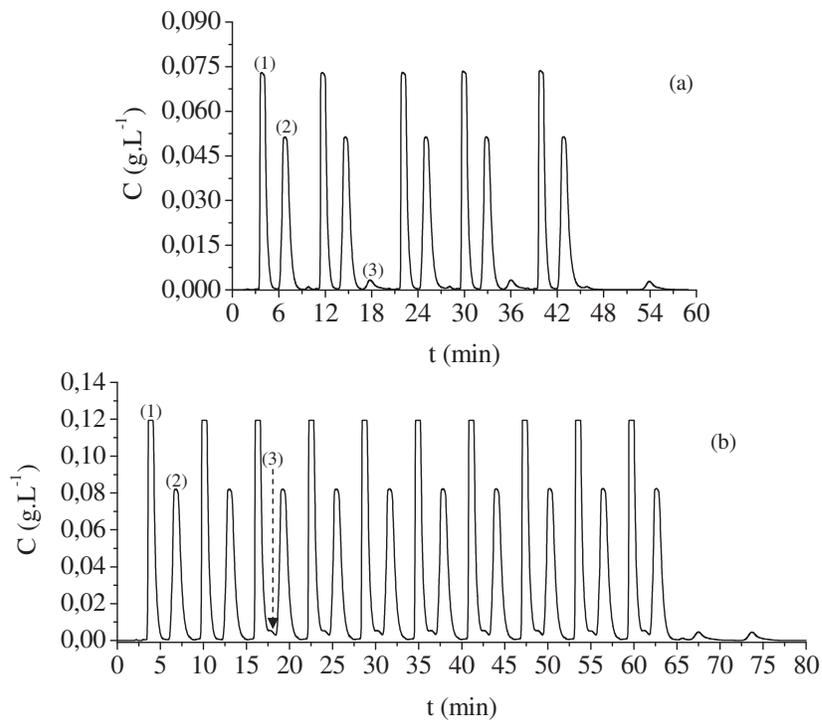


Figura 4.15 - Cromatograma de cinco (a) e dez (b) injeções empilhadas: (1) piperonal, (2) safrol/isosafrol, (3) terpinoleno.  $Q = 5,0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ; Temperatura =  $25^\circ\text{C}$ ; Pressão =  $25 \text{ kgf}\cdot\text{cm}^{-2}$ ;  $V_{\text{injeção}} = 800 \mu\text{L}$ ; coluna =  $25 \times 1,0 \text{ cm}$ ; Fase móvel: acetonitrila/água - 70/30 (v/v);  $C = 9,50 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  (89,3% de piperonal + 1,79% de safrol + 7,96% de isosafrol + 0,95% de terpinoleno).

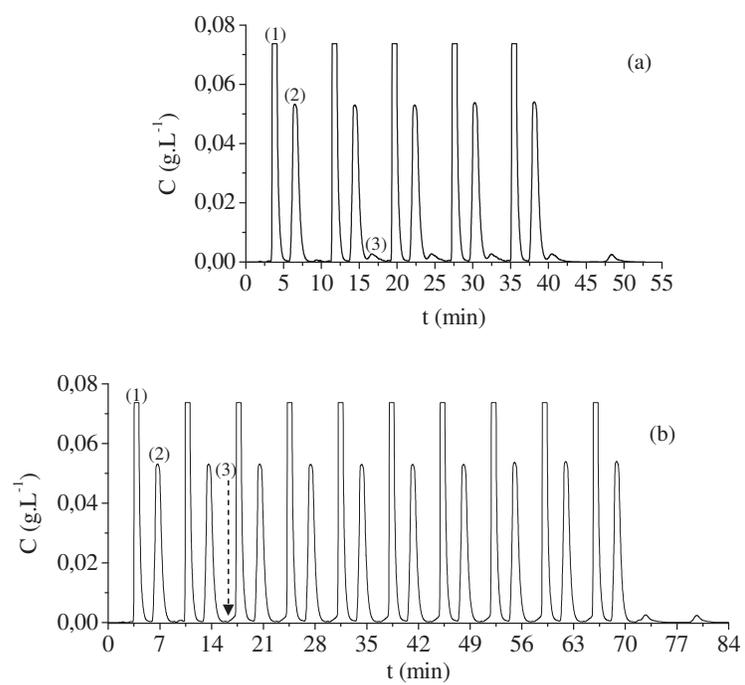


Figura 4.16 - Cromatograma de cinco (a) e dez (b) injeções empilhadas: (1) piperonal, (2) safrol/isosafrol, (3) terpinoleno.  $Q = 5,0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ; Temperatura =  $35^\circ\text{C}$ ; Pressão =  $25 \text{ kgf}\cdot\text{cm}^{-2}$ ;  $V_{\text{injeção}} = 800 \mu\text{L}$ ; Coluna =  $25 \times 1,0 \text{ cm}$ ; Detecção UV =  $245 \text{ nm}$ ; Fase móvel: acetonitrila/água - 70/30 (v/v);  $C = 9,50 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  (89,3% de piperonal + 1,79% de safrol + 7,96% de isosafrol + 0,95% de terpinoleno).

Separação cromatográfica da mistura de piperonal, safrol, isosafrol e terpinoleno foi conduzida também com fase móvel etanol/água, como alternativa à fase móvel discutida anteriormente. Os resultados são apresentados na Tabela 4.16 e Figura 4.17.

Tabela 4.16 - Parâmetros de desempenho à 35°C

Etanol/água - 70:30 (v/v)					
Injeções	Pu (%)	Y (%)	Pr (mg.min <sup>-1</sup> )	CS (mL.mg <sup>-1</sup> )	SP (mg.mL <sup>-1</sup> )
10	98,67	98,46	1,08	9,90	0,10
10	98,67	98,46	1,08	9,90	0,10

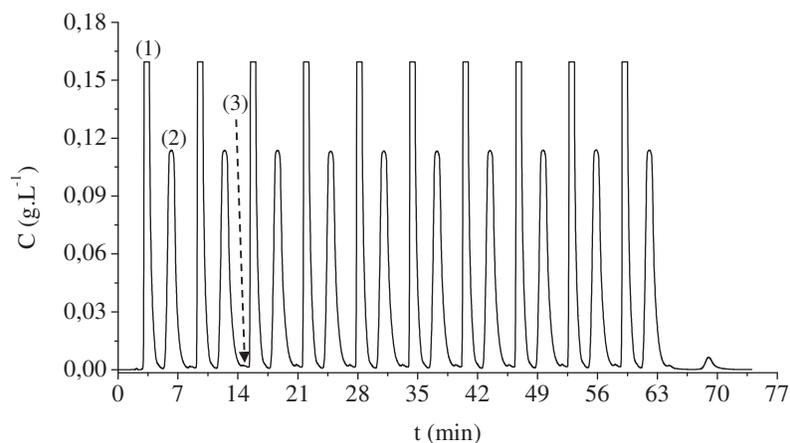


Figura 4.17 - Cromatograma referente a dez injeções empilhadas: (1) piperonal, (2) safrol/isosafrol, (3) terpinoleno.  $Q = 5,0 \text{ mL.min}^{-1}$ ; Temperatura = 35°C; Pressão = 70 kgf.cm<sup>-2</sup>;  $V_{\text{injeção}} = 800 \text{ }\mu\text{L}$ ; Detecção UV = 245 nm; coluna = 25 x 1,0 cm; Fase Móvel: etanol/água – 70/30 (v/v);  $C = 9,5 \text{ g.L}^{-1}$  (89,3% de piperonal + 1,79% de safrol + 7,96% de isosafrol + 0,95% de terpinoleno).

Os resultados com acetonitrila/água à 35°C apresentados na Tabela 4.15 quando comparados com os valores da Tabela 4.14 é observado que a pureza não foi afetada de forma significativa, a recuperação apresenta valores muito semelhantes e o consumo de solvente é menor em relação à menor quantidade injetada. Vale ressaltar que a produção e a produtividade específica apresentaram um aumento em relação a cinco injeções e uma diminuição em relação a dez injeções. Isto pode estar relacionado à diminuição da retenção por causa do aumento da temperatura.

Nota-se que em termos de pureza e recuperação, os valores são próximos quando comparados àqueles relacionados à fase móvel acetonitrila/água na mesma temperatura, porém, a produção e produtividade específica são maiores. Já o consumo de solvente é aproximadamente igual. Essas observações indicam que não há vantagem significativa da fase móvel etanol/água sobre acetonitrila/água, podendo ser utilizada qualquer uma das duas. Entretanto, observações experimentais mostraram que a fase móvel etanol/água atenua a intensidade da banda cromatográfica. Isso torna o método de detecção menos sensível, diminuindo o limite de quantificação quando essa fase móvel estiver sendo utilizada.

Vale ressaltar que a viscosidade da mistura etanol/água é 2,3 vezes maior que a viscosidade de acetonitrila/água (ver Tabela 4.4), motivo pelo qual, não se realizou experimento à 25°C, pois a coluna apresentou valores de queda de pressão extremamente elevados quando esta fase móvel foi usada, sendo portanto, considerada uma condição crítica de separação.

Estudos mostram que a CLAE semipreparativa com injeção empilhada é uma técnica que fornece altas purezas, mesmo para misturas mais concentradas ou até mesmo multicomponentes. Entretanto, parte do trabalho de pesquisa, deve envolver a busca por um equilíbrio entre pureza, recuperação e produção (DO *et al* 2014; ZONGDE *et al.* 2005; WHITE 2005; HUBER e MAJORS, 2007).

Nota-se nas Tabelas 4.14 – 4.16 em que as purezas e as recuperações estão entre 97 e 98 %. Esses resultados mostram que está ocorrendo o toque de banda (ou sobreposição de banda) nas condições empregadas, sendo a concentração, que no caso é 9,50 g.L<sup>-1</sup>, a condição mais influente. Esse mesmo valor foi usado na obtenção das isotermas de Langmuir (em solução concentrada) pelo método do tempo de retenção cujo pressuposto básico é observação do toque de banda, nos cromatogramas. Esse mesmo efeito é

observado nas Figuras 4.15 – 4.17, principalmente para dez injeções empilhadas. A sobreposição ocorre entre as bandas do piperonal (componente 1) e safrol+isosafrol (componente 2). Após a terceira injeção empilhada ocorre a sobreposição do terpinoleno (componente 3) entre os dois componentes. Estas observações indicam que os experimentos foram conduzidos sob condição não linear, sendo que o equilíbrio foi satisfatoriamente descrito pelo modelo de isoterma de Langmuir (ver Seção 4.3.2). Outra observação feita é que as bandas cromatográficas do safrol e isosafrol formam uma única banda em solução concentrada, conforme as Figuras 4.15 – 4.15. Assim sendo, tal solução pode até ser considerada, dentro de certos limites, uma mistura pseudo-binária, uma vez que a concentração de terpinoleno é extremamente baixa, na concentração total de  $9,50 \text{ g. L}^{-1}$ .

Conforme os resultados apresentados nas Tabelas 4.14 – 4.16, o melhor sistema experimental de obtenção de piperonal é aquele à  $25^{\circ}\text{C}$  na fase móvel acetonitrila/água e com o maior número de injeções, pois fornece um balanço equilibrado entre a pureza, recuperação e produção.

#### **4.6 Separação cromatográfica por injeção empilhada: abordagem teórica**

A injeção empilhada é uma técnica útil na análise de amostras complexas e na produção de substância puras em escala semipreparativa (DRAHRUMAN *et al.*, 2011; MILLER, 2012; BAUDELET *et al.*, 2014). Porém, a maioria destes ensaios é focada apenas na abordagem experimental, onde os tempos de ciclo e coleta são obtidos diretamente do cromatograma. Como a pureza, a recuperação e a produção dependem da concentração injetada, a cada novo experimento que utilize concentração diferente é necessário recalcular esses tempos. Por outro lado, com o empregado da abordagem teórica, conforme proposta nesta Tese, é possível projetar a quantidade da substância de interesse a ser obtida sem que seja necessário realizar os experimentos para obtenção do cromatograma, pois a partir dos parâmetros de equilíbrio e de transferência de massa foi possível calcular os tempos de ciclo e de coleta, diminuindo o tempo de análise e o consumo de reagente.

Os resultados apresentados na Tabela 4.17 foram obtidos a partir do cálculo do primeiro momento, utilizando-se a Equação (2.31), e do segundo momento com a Equação (2.32). Essas duas equações necessitam das constantes de equilíbrio, dos

parâmetros de transferência de massa, além do coeficiente de dispersão axial obtido pela correlação de Athalye *et al.*, (1992) com base na discussão apresentada na Seção 4.4.

Tabela 4.17 - Cálculo do primeiro e do segundo momento da curva gaussiana.

Substância	ACN-H <sub>2</sub> O/ 25°C	ACN-H <sub>2</sub> O/ 35°C	EtOH-H <sub>2</sub> O/35°C
	$t_R \pm 4\sigma$	$t_R \pm 4\sigma$	$t_R \pm 4\sigma$
<b>Piperonal</b>	3,760 ± 0,0884	3,723 ± 0,318	3,446 ± 0,355
<b>Safrol</b>	7,3336 ± 0,696	5,816 ± 0,605	5,562 ± 0,736
<b>Isosafrol</b>	7,850 ± 0,742	6,099 ± 0,642	6,996 ± 0,746
<b>Terpinoleno</b>	15,545 ± 2,032	14, 111 ± 1,735	11,504 ± 1,742

ACN: acetonitrila; EtOH: etanol.

Para a realização dos experimentos de injeção empilhada, baseada no modelo proposto nesta Tese, são necessários os valores de tempo de ciclo e do intervalo de tempo para coleta da fração de interesse, no caso a fração contendo piperonal. Em todos os experimentos da Tabela 4.18 foi aplicado o seguinte procedimento: para encontrar o tempo inicial, utilizou-se a Equação (2.16), já o tempo final, utilizou-se o primeiro momento da curva cromatográfica do isosafrol, porém com desvio padrão positivo, conforme a Equação (2.21). O tempo de ciclo foi obtido pela diferença entre o tempo final e o tempo inicial. O intervalo de tempo da coleta das frações foi obtido do primeiro momento da curva cromatográfica do piperonal com desvio padrão positivo, de acordo com a Equação (2.22). Com os tempos de ciclo e de coleta, montou-se uma programação de dez injeções empilhadas e os resultados são apresentados na Tabela 4.18 e nas Figuras 4.18 – 4.19, sendo o componente 1, o piperonal e o componente 2, constituído por safrol e isosafrol.

Tabela 4.18 - Parâmetros de desempenho para dez injeções.

Fase móvel	T (°C)	Pu (%)	Y (%)	Pr (µg.min <sup>-1</sup> )	CS (mL.µg <sup>-1</sup> )	SP (µg.mL <sup>-1</sup> )
ACN/H <sub>2</sub> O	25	100	100	0,680	9,362	0,107
ACN/H <sub>2</sub> O	35	100	100	0,997	6,383	0,157
EtOH/H <sub>2</sub> O	35	100	100	0,548	11,609	0,086

**Pu:** pureza; **Y:** recuperação; **Pr:** produção; **CS:** consumo de solvente; **SP:** produtividade específica.

Nota-se da Tabela 4.18 que a pureza e a recuperação foram extremamente elevadas o que era desejado, uma vez que esses experimentos foram conduzidos sob condição linear e, portanto com resolução na linha de base, não havendo, segundo o modelo, a sobreposição

de banda nem contaminação da fração de piperonal pela fração constituída de safrol, isosafrol e terpinoleno. Essa observação é reforçada pelo fator de separação das Tabelas 4.3 – 4.5 que são de 3 a 16 vezes maiores que a unidade, indicando separação completa (LINDSAY, 1992; RILEY, 1996).

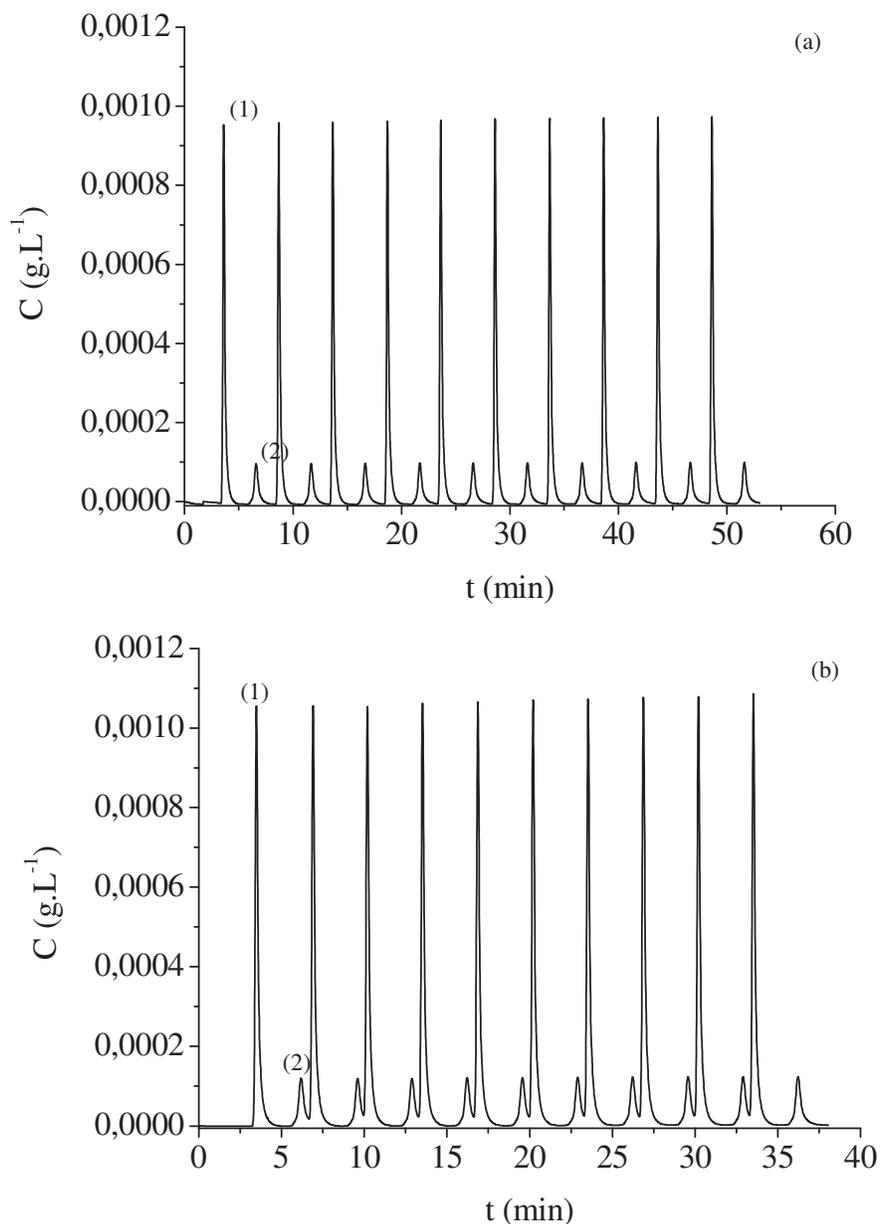


Figura 4.18–Separação por injeção empilhada. Condições experimentais:  $Q = 5,0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ; Fase móvel = acetonitrila/água;  $C = 0,190 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  (89,3% de piperonal + 1,79% de safrol + 7,96% de isosafrol + 0,95% de terpinoleno). Temperatura (a)  $25^\circ\text{C}$  e (b)  $35^\circ\text{C}$ .

Entretanto, a Figura 4.18b apresenta sobreposição das bandas cromatográficas do piperonal (componente 1) e do safrol + isosafrol (componente 2). Segundo a previsão do modelo proposto nesta Tese, tal situação não deveria ocorrer, uma vez que os experimentos foram realizados sob condição de diluição infinita para que o equilíbrio de adsorção pudesse ser representado por uma isoterma linear. Essa sobreposição levaria, principalmente, à diminuição da pureza e recuperação. Contudo, na Tabela 4.18, os valores de pureza e recuperação são de aproximadamente 100% para todos os sistemas estudados, inclusive para acetonitrila/água à 35°C que gerou a Figura 4.18b. Essa discrepância observada para este sistema reforça o fato de que a melhor condição de separação reside no sistema acetonitrila/água à 25°C.

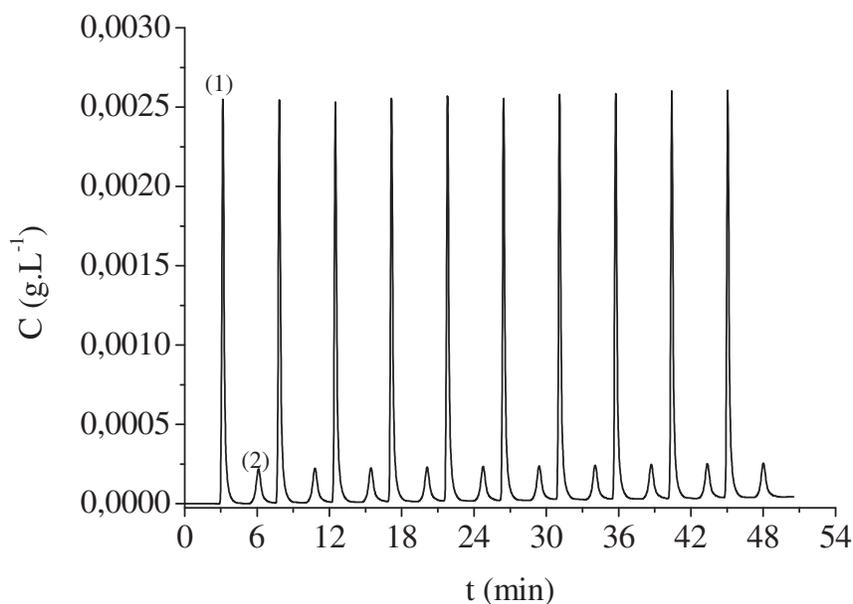


Figura 4.19 – Separação por injeção empilhada. Condições experimentais:  $Q = 5,0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ; Fase móvel = etanol/água; Temperatura = 35°C;  $C = 0,190 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  (89,3% de piperonal + 1,79% de safrol + 7,96% de isosafrol + 0,95% de terpinoleno).

A abordagem teórica fornece pureza e recuperação maiores em relação à abordagem experimental. Por outro lado, a produção é baixa, uma vez que a concentração da solução é menor. Portanto, quando se deseja pureza e recuperação elevadas é aconselhável separar o piperonal a partir de soluções diluídas onde o equilíbrio será descrito por isoterma linear, quando a alta produção, com menor pureza e recuperação, é o objetivo, separa-se o

piperonal a partir de soluções concentradas onde o equilíbrio será representado por isotermas do tipo Langmuir.

# Capítulo 5

## 5. Conclusões

---

Os resultados quanto às constantes de equilíbrio obtidas a partir do primeiro momento da curva cromatográfica mostraram que os componentes da mistura tem a seguinte ordem crescente de afinidade: piperonal, safrol, isosafrol e terpinoleno, em relação à fase estacionária  $C_{18}$  para as fases móveis acetonitrila/água e etanol/água. Essa é, também, a ordem de eluição dos respectivos componentes. Os resultados indicam, inclusive, que o piperonal pode ser separado da mistura multicomponente ou até mesmo em combinações binárias com qualquer um dos componentes da mistura. Fato que é corroborado pelos parâmetros cromatográficos fator de separação e resolução os quais estão dentro daqueles recomendados pela literatura. Vale ressaltar que as constantes de equilíbrio são parâmetros fundamentais na obtenção dos coeficientes de transferência de massa.

A transferência de massa global, cujos coeficientes foram obtidos a partir do segundo momento da curva cromatográfica, é controlada tanto pela resistência quanto pela resistência interna. Este último efeito está relacionada ao mecanismo de difusão efetivo nos poros do adsorvente, sendo que parte desse mecanismo é descrito pela difusão superficial. Vale ressaltar que o modelo de equação de balanço de massa diferencial que considera o coeficiente de difusão nos poros não se ajustou aos dados experimentais, significando que o mecanismo de difusão possuía outras contribuições. Foi constatado mediante a utilização de um novo modelo, que tais contribuições se devem ao mecanismo de difusão superficial. Assim sendo, a difusão em fase reversa empregada nesta Tese é explicada em parte pela difusão nos poros e em parte pela difusão superficial. Por outro lado, os coeficientes de dispersão axial mostram a mesma ordem de grandeza para todos os sistemas estudados. Quando comparados com as correlações mais usadas na literatura, a análise mostrou que a correlação de Athalye *et al.* (1992) foi a correlação que melhor descreveu a dispersão axial na coluna semipreparativa utilizada. Além disso, os valores encontrados para os

coeficientes efetivos de difusão e de dispersão axial encontram-se dentro daqueles usualmente previstos na literatura, o que corrobora o método dos momentos empregado neste trabalho.

Os resultados experimentais em relação aos parâmetros de equilíbrio, transferência de massa e de dispersão axial obtidos neste trabalho podem ser usados para ampliar escala de produção de substâncias puras em técnicas de separação cromatográficas, tanto em batelada quanto contínua.

Quanto à caracterização do leito, os resultados encontrados mostraram que a menor queda de pressão produzida pela coluna semipreparativa ocorreu quando se utilizou acetonitrila na fase móvel ao invés de etanol. Por outro lado, a porosidade total obtida pelo primeiro momento de uma substância não retida apresentaram valores normalmente encontrados na literatura, tanto na coluna analítica quanto na coluna semipreparativa

A técnica de injeção empilhada foi aplicada na separação de piperonal mediante a implementação de duas abordagens: a abordagem experimental, onde os tempos de ciclo e de coleta são obtidos diretamente do cromatograma. E a abordagem teórica, proposta nesta Tese, na qual os tempos foram calculados a partir do modelo proposto com base no primeiro e no segundo momento curva cromatográfica, considerando-se isoterma lineares. Nesta Tese, tanto a abordagem teórica quanto a experimental apresentaram o sistema cromatográfico acetonitrila/água a 25°C como a melhor condição de separação para dez injeções empilhadas.

Ressalta-se que o modelo proposto nesta Tese é de fácil operacionalização experimental. A diminuição do tempo de análise, uma vez que não é necessário obter o cromatograma, e do consumo de reagentes são outras vantagens da abordagem teórica, utilizando o modelo. Em relação aos parâmetros de desempenho, o modelo conduziu, por exemplo, a purezas superiores a 99%, sob condição de diluição infinita. Além disso, a maioria dos trabalhos encontrados na literatura, que utilizam a técnica de injeção empilhada, não apresentam modelos pelos quais se possam programar eventos de injeção, sendo, portanto mais uma contribuição deste estudo, na separação e purificação de substâncias contidas em misturas multicomponentes.

Finalizando, a CLAE semipreparativa por injeção empilhada mostrou-se bastante eficiente em termos de produção de piperonal com elevado grau de pureza. Além disso, a quantidade de massa injetada não afeta significativamente a pureza. Os resultados indicam também que uma quantidade maior de amostra pode ser injetada e que as informações

operacionais apresentadas neste estudo podem ser facilmente implementadas em cromatografia preparativa para obter grandes quantidades de piperonal puro.

### **5.1 Sugestões para trabalhos futuros**

Como sugestão para trabalhos futuros tem-se:

- (1) Proposição de modelo para separação do piperonal considerando isothermas não lineares, ou seja, utilizando soluções concentradas.
- (2) Determinação dos parâmetros de transferência de massa, considerando as isothermas não-lineares, usando a técnica dos momentos (MIYABE e GUIOCHON, 2000).
- (3) Automatização dos eventos de injeção empilhada bem como das frações coletadas.
- (4) Procedimento de troca da cela do detector para avaliar o aumento da concentração da solução de trabalho.
- (5) Separação e produção de piperonal por Cromatografia de Fluido Supercrítico com injeção empilhada. Os resultados podem ser comparados com aqueles obtidos em CLAE.
- (6) Avaliar a separação do piperonal por cromatografias contínuas como o leito móvel simulado clássico e leito móvel simulado com variação no tamanho da coluna.

## REFÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRZEJEWSKA, A.; KACZMARSKI, K. GUIOCHON, G. Theoretical study of the accuracy of the pulse method, frontal analysis, and frontal analysis by characteristic points for the determination of single component adsorption isotherms. *Journal of Chromatography A*. v. 1216, p. 1067-1083, 2009.

ARNOLD, F. H.; BLANCH, H. W.; WILKE, C. R. Liquid chromatography plate height equations. *Journal of Chromatography*. v. 330, p. 15-166, 1985.

ATHALYE, A. M.; GIBBS, S. J.; LIGHTFOOT, E. N. Predictability of chromatographic protein separations: Study of size-exclusion media with narrow particle size distributions. *Journal of Chromatography A*. v. 589, n<sup>o</sup>. 1, p.71-85, 1992.

BAILEY, J. M.; OLLIS, D. F. *Biochemical Engineering Fundamentals*. 2 nd. New York: McGraw-Hill, 1986.

BAUER, K.; GARBE, D.; SURBERG, H. Flavors and Fragrances. In: *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*. 5 th ed. Deerfield Beach: Wiley-VCH, 2002.

BAUDELET, D.; SCHIFANO-FAUX, N.; GHINET, A.; DEZITTER, X.; BARBOTIN, F.; GAUTRET, P.; RIGO, B.; CHAVATTE, P.; MILLET, R.; FURMAN, C.; VACCHER, C. LIPKA, E. Enantioseparation of pyroglutamide derivatives on ollysaccharide based chiral stationary phases by high-performance liquid chromatography and supercritical fluid chromatography: a comparative study. *Journal of Chromatography A*, xxx (2014) xxx–xxx. Artigo in press.

BLAIR, E. A; HILL, D. The Welsbach Corporation. Process for producing aromatic carbonyl compounds and peroxide compounds. USA n. 2916499, 28 out. 1957, 8 dez 1959.

BRAGA, N. P. Processo de obtenção e separação do piperonal a partir do óleo essencial de pimenta-longa (*Piper hispidinervun* C. DC). Campinas, 2007. 265 p. Tese (Doutorado em

Engenharia) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2007.

CHEN, L.; MA, H.; LIU, X.; JIANG, S. X. Semipreparative Enantiomer Separation of Propranolol Hydrochloride by High-Performance Liquid Chromatography Using Cellulose *tris*(3,5- Dimethylphenylcarbamate) Chiral Stationary Phase. *Journal of Chromatographic Science*. v. 46, p. 767 – 771, 2008.

CHUNG, S. F.; WEN, C. Y. Longitudinal dispersion of liquid flowing through fixed and fluidized beds. *AIChE Journal*, 14: 857-866, 1968.

CLAESSENS, H. A.; VAN STRATEN, M. A.; KIRKLAND, J. J. Effect of buffers on silica-based column stability in reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, v. 728, p. 259-270, 1996.

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

COLLINS, H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. *Fundamentos de cromatografia*. Campinas-SP: Editora UNICAMP, 2006, 453p.

COULSON, J. M.; RICHARDSON, J. F., *Tecnologia Química*, Fundação Calouste Gulbenkian, v. 2, 2ª Edição, 1968.

CREMASCO, M. A.; WANG, N.-H., L.; HRITZKO, B. J. Parameters estimation for amino acids adsorption in a fixed bed by moment analysis. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, v.18, no. 1, p.: 181-184, 2001.

CREMASCO, M. A. *Fundamentos de transferência de massa*. 2 ed. Campinas: UNICAMP, 2002. 765 p.

COSTA, P.; PILLI, R.; PINHEIRO, S.; VASCONCELOS, M. Substâncias Carboniladas e derivados. Porto Alegre: Bookman, 2003.

DANTUS, M. M.; WELLS, M. L. Regulatory issues in chromatographic analysis in the pharmaceutical industry. *Journal of liquid chromatography & related technologies*, v. 27, n. 7-9, p. 1413-1442, 2005.

DELGADO, J. M. P. Q. A critical review of dispersion in packed beds. *Heat mass transfer*. v. 42, p. 279-310, 2006

DHARUMAN, J.; VASUDHEVAN, M.; AJITHLAL, T. High performance liquid chromatographic method for the determination of cetirizine and ambroxol in human plasma and urine - A boxcar approach. *Journal of Chromatography B*. v. 879, p 2624–2631, 2011.

DINCER, I. Moisture transfer analysis during drying of slab woods. *Heat and Mass Transfer*. v. 34, p. 317 – 320, 1998.

DO, T. K. T.; HADJI-MINAGLOU, F.; ANTONIOTTI, S.; FERNANDEZ, X. Secondary metabolites isolation in natural products chemistry: Comparison of two semipreparative chromatographic techniques (high pressure liquid chromatography and high performance thin-layer chromatography). *Journal of Chromatography. A*, v. 1325, p. 256–260, 2014.

ELBRO, H. S.; FREDENSLUND, A.; RASMUSSEN, P. Group contribution method for the prediction liquid densities as a function of temperature for solvents, oligomers, and polymers. *Industrial and Engineering Chemical Research*. v. 30, n. 12, p. 2576–2582, 1991.

FARINACCI, N. T. Oxidation of organic compounds with a chromic oxidizing agent. USA n. 2794813, 15 set. 1953, 4 jun 1957.

FERRARI, W. M. C. S. Estudo termodinâmico da separação do ibuprofeno racêmico por cromatografia líquida quiral utilizando a fase estacionária tris (3,5-dimetilfenilcarbamato) de celulose. Campinas, 2014. 84 p. Tese (Dissertação de mestrado em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2014.

FORNSTEDT, T.; SAJONZ, P.; GUIOCHON, G. Thermodynamic Study of an Unusual Chiral Separation Propranolol Enantiomers on an Immobilized Cellulase. *Journal American Chemical Society*, v. 119, p. 1254-1264, 1997.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (USA) (FDA). Validation of Chromatographic methods: relatório técnico. Maryland, 1994.

GENTILINI, A.; MIGLIORINI, C.; MAZZOTTI, M.; MORBIDELLI, M. Optimal operation of simulated moving-bed units for non-linear chromatographic separations: II Bi-Langmuir isotherm. *Journal of Chromatography A*. v. 805, p. 37 – 44, 1998.

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

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

GUIOCHON, G.; FELINGER, A.; SHIRAZI, D. G.; KATTI, A. M. Fundamentals of preparative and nonlinear Chromatography. 2<sup>o</sup> ed. San Diego: Elsevier, 2006.

GUNN, D. J. Axial and radial dispersion in fixed beds. *Chemical Engineering Science*. v. 42, n<sup>o</sup>. 2, p.363-373, 1987.

HAMILTON, R. J.; SEWELL, P. A. Introduction to high performance liquid chromatography. New York: Halsted Press Book, 1978.

HICKEY, K.; WAGHORNE, W. E. Viscosities and volumes of dilute solutions of formamide in water+acetonitrile and for formamide and N,N-Dimethylformamide in methanol+acetonitrile mixed solvents: viscosities B-coefficients, activation free energies for viscous flow, and partial molar volumes. *Journal of Chemical and Engineering Data*, v. 46, p. 851-857, 2001.

HEYNES, H. W. J. The determination of effective diffusivity by gas chromatography: time domain solution. *Chemical Engineering Science*. v. 30, p. 955-961, 1975.

HUBER, U.; MAJORS, R. E. Principles in preparative HPLC: a primer. Agilent Technologies Application Note, p. 1-85, 2007.

JACOBSON, S.; GOLSHAN-SHIRAZI, S.; GUIOCHON, G. Isotherm Selection for Band Profile Simulations in Preparative Chromatography. *AIChE Journal*, v. 37, no. 6, p. 836-844, 1991.

HONG, L.; FELINGER, A.; KACZMARSKI, K.; GUIOCHON, G. Measurement of intraparticle diffusion in reversed phase liquid chromatography. *Chemical Engineering Science*, v. 59, p. 3399 – 3412, 2004.

HORIKAWA, Y.; KAMEZAWA, K.; KANOMATA, T.; BOUNOSHITA, M.; SAITO, M. Novel Injection Method in Preparative Supercritical Fluid Chromatography. Packed-Column SFC 2008, Switzerland.

KASPEREIT, M.; LORENZ, H.; SEIDEL-MORGENSTERN, A. Coupling of simulated moving bed technology and crystallization to separate enantiomers. *Fundamentals of Adsorption 7*, International Adsorption Society, Japan, p.101-108, 2002.

KHATTAB, I. S.; BANDARKAR, F.; FAKHREE, M. A. A.; JOUYBAN, A.. Density, viscosity, and surface tension of water+ethanol mixtures from 293 to 323K. *Korean Journal Chemical Engineering*. v. 29, n. 6, p. 812 – 817, 2012.

KIM, H., GRITTI, F.; GUIOCHON, G. Effect of the temperature on the isotherm parameters of phenol in reversed-phase liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, v. 1049, p. 25–36, 2004.

KIRKLAND, J. J. Development of some stationary phases for reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, v. 1060, p. 9–21, 2004.

KOCH, D. L.; BRADY, J. F. Dispersion in fixed beds. *Journal Fluid Mechanics*. v. 154, n. 5, p. 399-427, 1985.

KUMAR, R.; MARTENS, J.; BHUSHAN, R. Enantiomerization study of atropine and its semipreparative enantioseparation along with (1RS,2SR)-(±)-Ephedrine on polyacrylamide column using High-Performance Liquid Chromatography. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*. v. 38, p. 111 – 116, 2015.

YALKOWSKY, S. H.; HE, Y. *Handbook of aqueous solubility data*. Boca Raton: CRC press, 2003.

JOHNSON, P. R.; L. D., BOWERS. Measurement of urinary estriol by immobilized enzymes and boxcar chromatography. *Analytical Chemistry*. v. 54, n. 13, p. 2247-2250, 1982.

LANÇAS, F. M. *Cromatografia Líquida Moderna: HPLC/CLAE*. Editora: Átomo, Campinas, 2009, 381p.

LIDE, D. R. *Handbook of Chemistry and Physics*. 91<sup>th</sup> ed. Boca Raton :CRC, 2011.

LINDSAY, S. *High Performance Liquid Chromatography: analytical chemistry by open learning*. 2 nd. Chichester: John Wiley & Sons, 1992, 360p.

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

LUONG, J.; GRAS, R.; SHELLIE, R. A.; CORTES, H. J. Direct measurement of part-per-billion levels of dimethyl sulfoxide in water by gas chromatography with stacked injection and chemiluminescence detection. *Journal of Separation Science*. v. 35, p. 1486–1493, 2012.

LUDEMANN-HOMBOURGER, O.; PIGORINI, G.; NICOUD, R. M.; ROSS, D.S.; G. TERFLOTH. Application of the "VARICOL" process to the separation of the isomers of the SB-553261 racemate. *Journal of Chromatography A*. v. 947, p.59–68, 2002.

MA, Z.; WHITLEY, R. D.; WANG, L. N. H. Pore and surface diffusion in multicomponent adsorption and liquid chromatography systems. *AIChem Journal*. v. 42, n° 5, p. 1244 – 1262, 1996.

MAIA, J. G. S.; SILVA, M. L.; LUZ, A. I. R.; ZOGHBI, M. G. B.; RAMOS, L. S. Espécies de Piper da Amazônia ricas em safrol. *Quimica Nova*. v. 10, n. 3, p. 200-204, 1987.

MACKIE, J. S.; MEARES, P., The Diffusion of Electrolytes in a Cation-Exchange Resin Membrane, *Proc.Roy.Sco.London, Ser.*, v. 267, p. 498-506, 1955.

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

MEYER, V. R. *Practical High-Performance Liquid Chromatography*. 4 th. Wienheim: John Wiley & Sons, 2004.

MIGLIORINI, C.; MAZZOTTI, M.; MORBIDELLI, M. Design of simulated moving bed multicomponent separations: Langmuir systems. *Separation and Purification Technology*. v. 20, p. 79-96, 2000.

MIYABE, K.; SUZUKI, M. Chromatography of liquid-phase adsorption on octadecylsilyl-silica gel. *AIChem Journal*. v. 38, n°. 6, p. 901-909, 1992.

MIYABE, K.; GUIOCHON, G. Analysis of surface diffusion phenomena in reversed-phase liquid chromatography. *Analytical Chemistry*. v 71, p. 889-896, 1999.

MIYABE, K.; GUIOCHON, G. A Kinetic Study of Mass Transfer in Reversed-Phase Liquid Chromatography on a C<sub>18</sub>-Silica Gel. *Analytical Chemistry*. v 72, p. 5162-5171, 2000.

MIYABE, K. Surface diffusion in C<sub>18</sub>-silica monolithic stationary phase. *Journal of Chromatographic Science*. v. 47, p. 452 – 458, 2009.

MIYABE, K.; GUIOCHON, G. Surface diffusion in reversed-phase liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*. v. 1217, p. 1713 – 1734, 2010.

MILLER, L.; HONDA, D.; FRONEK, R.; HOWE, K. Examples of preparative chiral chromatography on an amylose-based chiral stationary phase in support of pharmaceutical research. *Journal of chromatography A*. v. 658, p. 429-435, 1994.

MILLER, L.; ORIHUELA, C.; D.; FRONEK, R.; MURPHY, J. Preparative chromatographic resolution of enantiomers using polar organic solvents with polysaccharide chiral stationary phases. *Journal of chromatography A*. v. 865, p. 211-226, 1999.

MILLER, L.; GRILL, C.; YAN, T.; DAPREMONT, O.; HUTHMANN, E.; JUZA, M. Batch and simulated moving bed chromatographic resolution of a pharmaceutical racemate. *Journal of Chromatography A*. v. 1006, p. 267–280, 2003.

MILLER, L. Preparative enantioseparations using supercritical fluid chromatography. *Journal of Chromatography A*. v. 1250, p. 250 – 255, 2012.

MOREIRA, J. V. Estudo termodinâmico da região linear das isotermas de adsorção em sílica C<sub>18</sub> para os componentes da síntese do piperonal a partir do óleo essencial de pimenta-longa (*Piper hispidinervun* C. DC). Campinas, 2013. 265 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2013.

NAM, H.-G.; HAN, M.-G; YI, S. C.; CHANG, Y. K.; MUN, S.; KIM, J.-H. Optimization of productivity in a four-zone simulated moving bed process for separation of succinic acid and lactic acid. *Chemical Engineering Journal*. v. 171, p. 92–103, 2011.

NAZARETH, A.; JARAMILLO, L.; KARGER, B. L. and GIESE, ROGER W. Automated analysis of antiepileptic drugs in serum by column-switching high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography*. v. 309, p. 357-368, 1984.

NEUE, U. D. *HPLC Columns: Theory, technology and Practice*. Wiley-VCH, Milford, 1997, 393p.

NICOUD, R. M. Simulated moving bed chromatography for biomolecules. In: AHUJA, S. (Ed.). *Handbook of bioseparations. Separation science and technology*. Volume 2, Orlando: Academic Press, p. 475 – 507, 2000.

NIKAM, P. S.; SHIRSAT, L. N.; HASAN, M. Density and Viscosity Studies of Binary Mixtures of Acetonitrile with Methanol, Ethanol, Propan-1-ol, Propan-2-ol, Butan-1-ol, 2-Methylpropan-1-ol, and 2-Methylpropan-2-ol at (298.15, 303.15, 308.15, and 313.15) K. *Journal of Chemical and Engineering Data*. v. 43, n. 5, p 732 – 737, 1998.

NOGLE. L. M.; C. W. MANN; W. L. WATTS JÚNIOR; Y. ZHANG. Preparative separation and identification of derivatized  $\beta$ -methylphenylalanine enantiomers by chiral SFC, HPLC and NMR for development of new peptide ligand mimetics in drug Discovery. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 40, p. 901–909, 2006.

PAIS, L. S.; LOUREIRO, J. M.; RODRIGUES, A. E. Separation of 1-bi-2-naphthol enantiomers by continuous chromatography in simulated moving bed. *Chemical Engineering Science*. v. 52, n. 2, p. 245 257, 1997.

OSAWA, A.E.; SITRIN, R.; LEE, S. S. Purification of pneumocandins by preparative silica-gel high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*. v. 831, p. 217–225, 1999.

PANG, F.-M.; SENG, C.-E.; TENG, T.-T.; IBRAHIM, M. H. Densities and viscosities of aqueous solutions of 1-propanol and 2-propanol at temperatures from 293.15 K to 333.15 K. *Journal of Molecular Liquids*. v. 136, p. 71–78, 2007.

PARTI, M. Mass transfer Biot numbers. *Periodica Polytechnica Search Mechanical Engineering*. v.38, n. 2-9, p. 109 – 122, 1994.

PERNA, R. F. Separação cromatográfica dos enantiômeros do fármaco verapamil em processo contínuo multicolumnas. Campinas, 2013. 195 p. Tese (Doutorado em Engenharia) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2013.

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

RAJENDRAN, A.; CHEN, W. Binary retention time method for rapid determination of competitive Langmuir isotherm parameters. *Separation and Purification Technology*, v. 67, p. 344-354, 2009.

RILEY, C. M. Efficiency, retention, selectivity and resolution chromatography. In: LOUGH, W. J.; WAINER, I. W. *High Performance Liquid Chromatography*. Glasgow: Blackie Academic & Professional, 1996, p. 15 – 35.

RUTHVEN, D. M. *Principles of adsorption and adsorption processes*. New York: John Wiley e Sons, 1984.

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

SARTI, A.; VIEIRA, L. G. T.; FORESTI, E.; ZAIAT, M. Influence of the liquid-phase mass transfer on the performance of a packed-bed bioreactor for wastewater treatment. *Bioresource Technology*. v. 78, p. 231 – 238, 2001.

SCHNEIDER, P.; SMITH, J. Adsorption rate Constant from Chromatography. *AIChem Journal*. v. 14, p.762-771, 1968.

SCHULTE, M.; EPPING, A. Fundamentals and general Terminology. In: Schmidt-Traub, H. (Ed.). *Preparative Chromatography of fine chemicals and pharmaceutical agents*. Weinheim: Wiley-VCH, p. 9-17, 2005a.

SEWELL, P. A.; CLARKE, B. A.; KEALEY, D. *Chromatographic Separations*. New York: John Wiley & Sons, 1987.

SKOOG, D. A, WEST, D. M., HOLLER, F. J., CROUCH, S. R. *Fundamentos de Química Analítica*, Editora Thomson, 8ª edição, 2006.

SIDDIQUI, M. A.; LUCAS, K. Correlations for prediction of diffusion in liquids. *The Canadian of Chemical Engineering*. v. 64, p. 839-843, 1986.

SILVA JÚNIOR, I. J. Separação cromatográfica dos enantiômeros do anestésico bupivacaína e projeto de condições de operação em leito móvel simulado. Campinas. 2006. 189. Tese (Doutorado em Engenharia Química)- Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006a.

SILVA JÚNIOR, I. J.; VEREDAS, V.; SANTOS, M. A. G.; SANTANA, C. C. Cromatografia em leito móvel simulado na produção de substâncias enantiomericamente puras ou enriquecida em largas escala. *Quimica Nova*. v. 29, n. 5, p.1027-1037, 2006b.

SILVA JÚNIOR, A. C. Aplicação do processo de cromatografia contínua (Varicol) na separação dos enantiômeros do mitotano utilizando a fase estacionária quiral tris-3,5(dimetilfenilcarbamato) de amilose. Campinas. 2012. 124. Tese (Doutorado em

Engenharia Química)- Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2012.

SNYDER, L. R.; VAN DER WAL, S.; DOLAN, J. W. Boxcar chromatography: a new approach to increased analysis rate and very large column plate numbers. *Journal of chromatography A*. v. 203, p. 3-17, 1981.

SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; DOLAN, J. W. Introduction to modern liquid chromatography. 3 rd. New Jersey: John Wiley & Sons, 2010.

SOLOMONS, T. W. G.; FRYHLE, C. Química Orgânica. 10 ed, LTC, Rio de Janeiro, 2012, 648p.

STARQUIT, A. N. V. R. D. Método alternativo para resolução numérica de modelo dinâmico para leito móvel simulado em condições de isotermas lineares. Campinas, 2004. 158 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.

THOMPSON, J. D.; CARR, P. W. High-Speed liquid chromatography by simultaneous optimization of temperature and eluent composition. *Analytical Chemistry*, v. 74, p. 4150-4159, 2002.

TOUMI, A.; ENGELL, S.; LUDEMANN-HOMBOURGER, O.; NICOUD, R.M.; BAILLY, M. *Journal of Chromatography A*, v. 1006, p. 15–31, 2003.

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

VAN DEEMTER, J. J.; ZUIDERWEG, F. J.; KLINKENBERG. Longitudinal diffusion and resistance to mass transfer as causes of nonideality in chromatography. *Chemical Engineering Science*. v. 5, p. 271-289, 1956.

VERHAGEN, L. C.; STRATING, J.; TJADEN, U. R. Analysis of E-Z-Nonenal in beer at the ultra-trace level by high-performance liquid chromatography using precolumn derivatization and column switching techniques. *Journal of Chromatography*. v. 393, p. 85 - 96, 1987.

VENTURA, M. C. Chiral Preparative Supercritical Fluid Chromatography. In: Webster, G. K. (Ed.). *Supercritical fluid chromatography: advances and applications in Pharmaceutical analysis*. Boca Raton: CRC press, p. 171 - 193, 2014.

WANKAT, P. C. *Rate-controlled separations*. New York: Blackie Academic & Professional, 1994.

WEWERS, W.; DINJENEN, J.; SCHULTE, M.; KINKEL, J. Selection of chromatographic systems. In: Schmidt-Traub, H. (Ed.). *Preparative Chromatography of fine chemicals and pharmaceutical agents*. Weinheim: Wiley-VCH, p. 107-172, 2005.

WHITE, C. Integration of supercritical fluid chromatography into drug discovery as a routine support tool. Part I. Fast chiral screening and purification. *Journal of Chromatography A*, v.1074, p. 163–173, 2005.

WILSON, E. J; GEANKOPLIS, C. J. Liquid mass transfer at very low Reynolds numbers in packed beds. *Industrial and Engineering Chemistry Fundamentals*. v. 5, n. 2, p. 9-14, 1966.

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

ZABKA M.; P. S. GOMES; A. E. RODRIGUES. Performance of simulated moving bed with conventional and monolith columns. *Separation and Purification Technology*, v. 63, p. 324–333, 2008.

ZHOU, D.; CHERRAK, D. E.; KACZMARSKI, K.; CAVAZZINI, A.; GUIOCHON, G. Prediction of the band profiles of the mixtures of the 1-indanol enantiomers from data acquired with the single racemic mixture. *Chemical Engineering Science*. v. 58, p. 3257 – 3272, 2003.

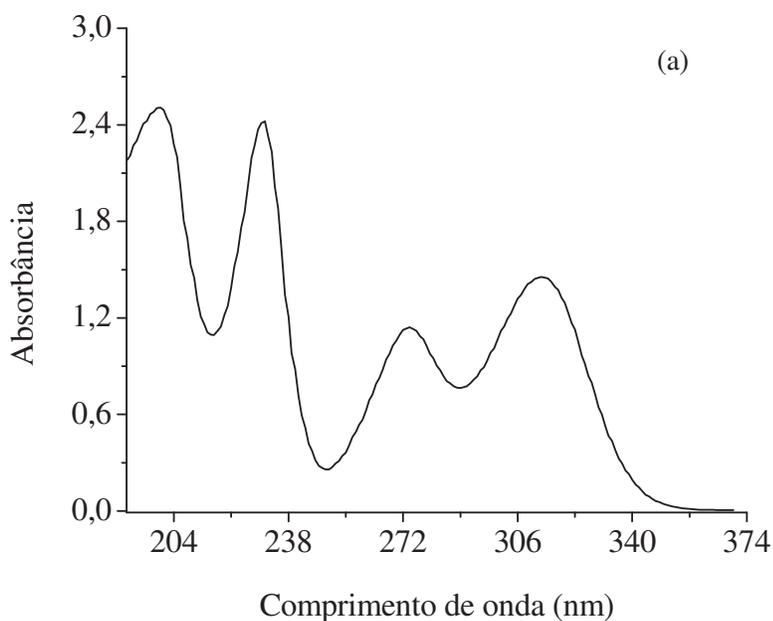
ZONGDE, Z.; XINGPING, L.; XIAOMEI, W.; HONG, Z.; YANPING, S.; LIREN, C.; YONGMIN, L. Analytical and semipreparative resolution of enantiomers of albendazole sulfoxide by HPLC on amylose tris(3,5-dimethylphenylcarbamate) chiral stationary phases. *Journal of Biochemical Biophysical Methods*, v. 62, p. 69-79, 2005.

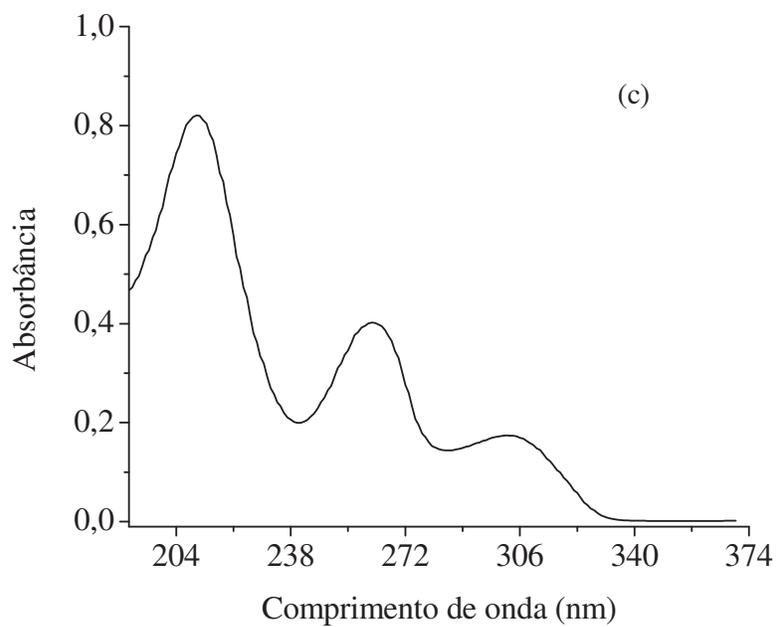
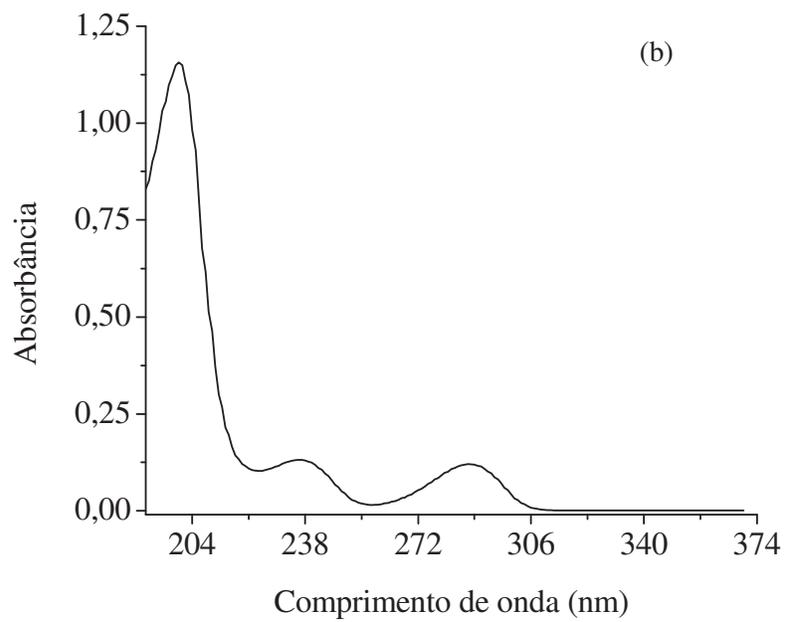
# APÊNDICE A

## 1. Obtenção dos espectros de absorção

---

Os espectros de absorção de cada componente da mistura foram obtidos no sistema cromatográfico descrito na seção 3.1. Primeiro, foi injetado uracil a  $0,10 \text{ g.L}^{-1}$  numa vazão de  $0,2 \text{ mL.min}^{-1}$  com detecção em  $254 \text{ nm}$ . Essa injeção foi necessária para se saber o tempo que o analito iria percorrer dentro do sistema até atingir o detector, uma vez que o cromatógrafo estava sem a coluna. Em seguida, fez-se uma injeção do analito para observar o comportamento de sua banda. Posteriormente, injetou-se novamente o analito e quando o seu sinal estava sendo registrado, a bomba foi desligada quando a banda estava a meia altura da linha de base. Então no software *LC solution*, acionou-se o botão “Scan” e deixou-se que o mesmo registrasse os espectros. Os resultados são apresentados na Figura 20.





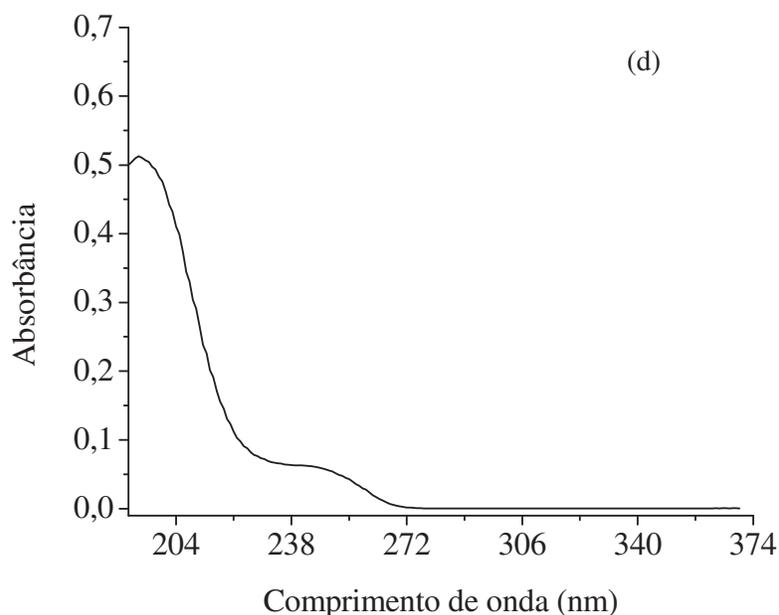


Figura 20. Espectro de absorvância de (a) piperonal, (b) safrol, (c) isosafrol e (d) terpinoleno. Condições experimentais:  $Q = 0,2 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ; Fase móvel: acetonitrila/água; Temperatura =  $25^{\circ}\text{C}$ ;  $V_{\text{injeção}} = 20 \mu\text{L}$ ;  $C = 0,10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ; Faixa de varredura = 190 – 370 nm; Passo de varredura = 1,0 nm.

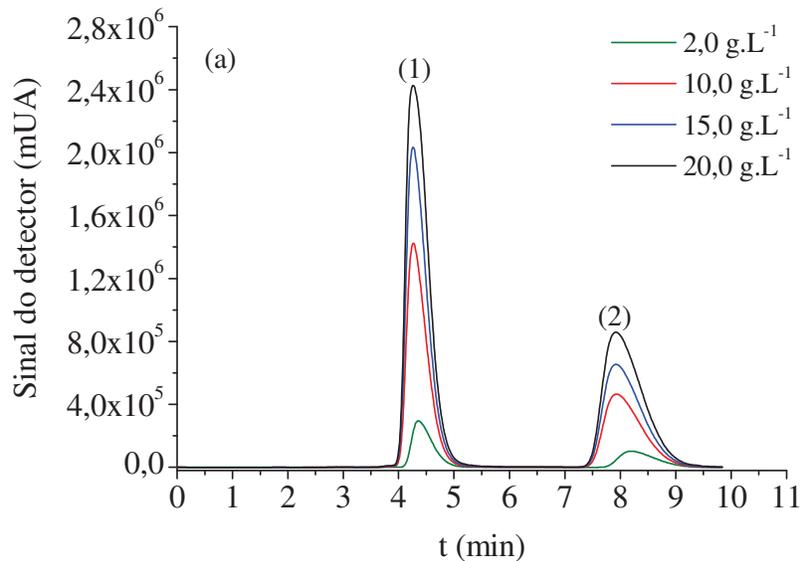
A partir da Figura 20, foi possível escolher o comprimento de onda a ser utilizado nas análises. Inicialmente escolheu-se, o comprimento de onda de 230 nm, porém, este comprimento mostra uma absorção muito intensa para o piperonal. Na tentativa de se obter um comprimento de onda que apresentasse uma absorção com intensidades aproximadas entre os quatro componentes, escolheu-se o comprimento de onda de 245 nm. Vale ressaltar que este procedimento elimina a necessidade de fazer a varredura por espectrofotometria.

Vale destacar que a concentração de cada componente foi escolhida com base na lei de Lambert-Beer e suas limitações.

# APÊNDICE B

## 1. Método do tempo de retenção binário

Para a utilização do método do tempo de retenção binário para estimar os parâmetros das isotermas é necessária a obtenção dos tempos das frentes de adsorção. Esses tempos podem ser obtidos pela sobrecarga da coluna até que ocorra o toque entre as bandas adjacentes dos componentes. No caso desta Tese, foi realizada a sobrecarga de massa, na qual se manteve constante o volume de injeção e variou-se a concentração, conforme as Figuras 21 – 24. Nesses cromatogramas (Figuras 21 – 24), aplicou-se a derivada primeira para obter o ponto de inflexão de cada banda. Esses pontos de inflexão são os tempos de retenção da frente de adsorção. Inserem-se esses tempos na rotina computacional descrita por Rajendran e Chen (2009) para ajustar os parâmetros da isoterma de Langmuir (Equação (2.4)).



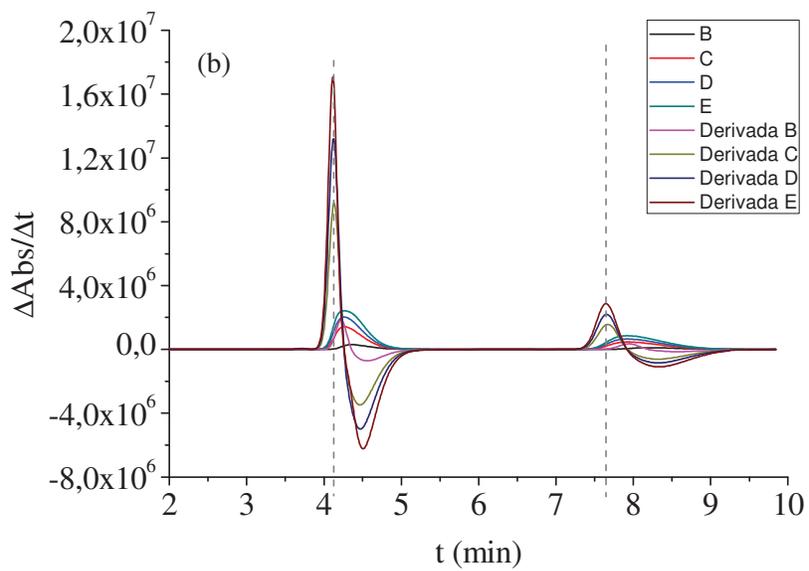
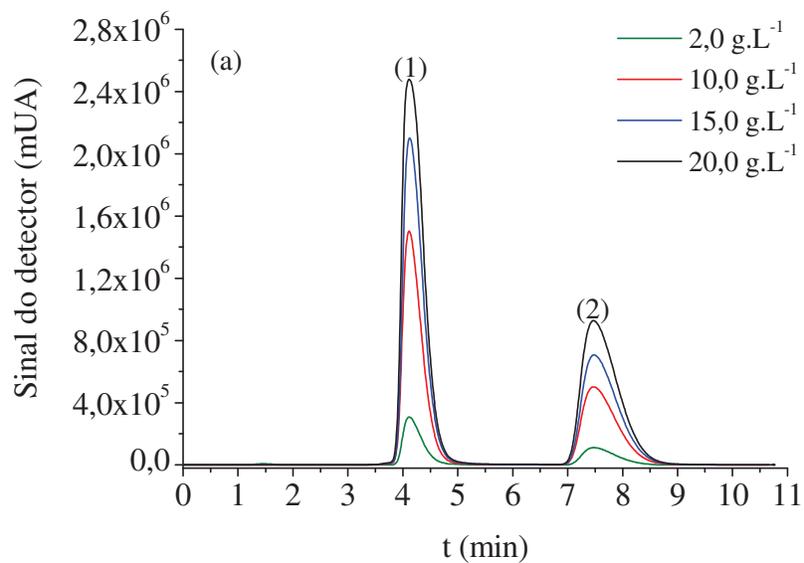


Figura 21. Cromatograma da mistura (1) piperonal e (2) safrol. (a) Condições experimentais:  $Q = 1,0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ; Fase móvel: acetonitrila/água; Coluna:  $25 \times 1,0 \text{ cm}$ ;  $V_{\text{injeção}} = 20 \text{ }\mu\text{L}$ ; Proporção: 50% de piperonal/50% de safrol; Temperatura =  $25^{\circ}\text{C}$ . (b) Derivada primeira referente aos dados experimentais:  $B = 2,0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ;  $C = 10,0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ;  $D = 15,0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ;  $E = 20,0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ .



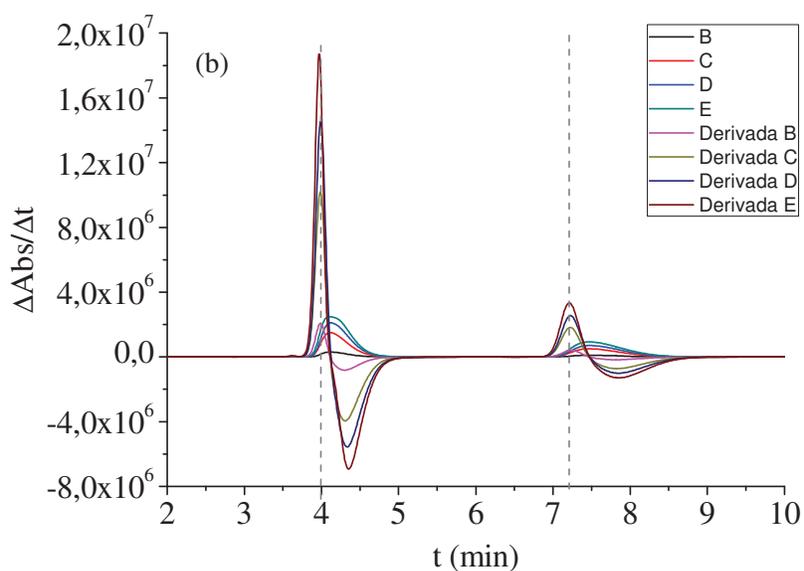
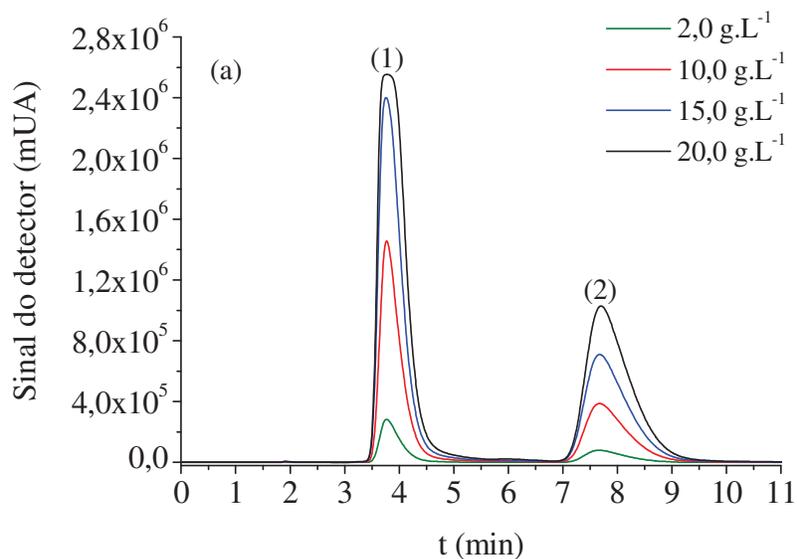


Figura 22. Cromatograma referente à mistura de (1) piperonal e (2) safrol. (a) Condições experimentais:  $Q = 1,0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ; Fase móvel: acetonitrila/água; Coluna:  $25 \times 1,0 \text{ cm}$ ;  $V_{\text{injeção}} = 20 \text{ }\mu\text{L}$ ; Proporção: 50% de piperonal/50% de safrol; Temperatura =  $35^{\circ}\text{C}$ . (b) Derivada primeira referente aos dados experimentais:  $B = 2,0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ;  $C = 10,0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ;  $D = 15,0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ;  $E = 20,0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ .



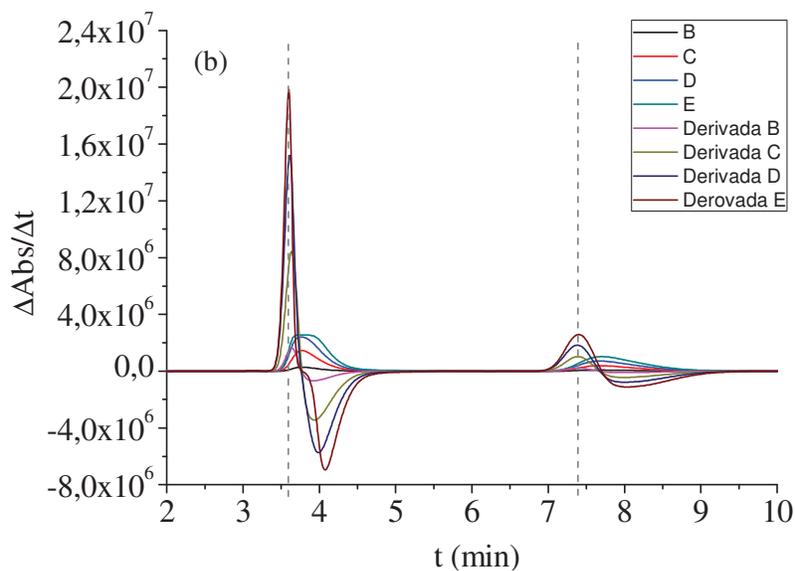
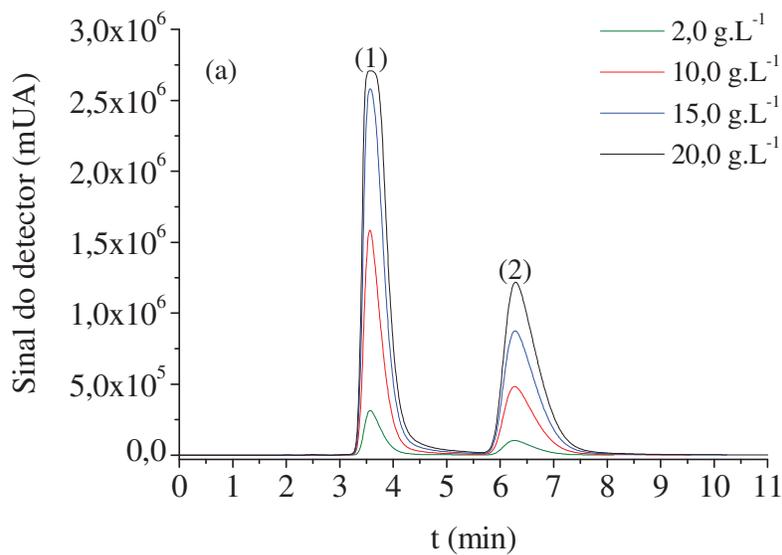


Figura 23. Cromatograma referente à mistura de (1) piperonal e (2) safrol. (a) Condições experimentais:  $Q = 1,0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ; Fase móvel: etanol/água; Coluna:  $25 \times 1,0 \text{ cm}$ ;  $V_{\text{injeção}} = 20 \text{ }\mu\text{L}$ ; Proporção: 50% de piperonal/50% de safrol; Temperatura =  $25^\circ\text{C}$ . (b) Derivada primeira referente aos dados experimentais: B =  $2,0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ; C =  $10,0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ; D =  $15,0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ; E =  $20,0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ .



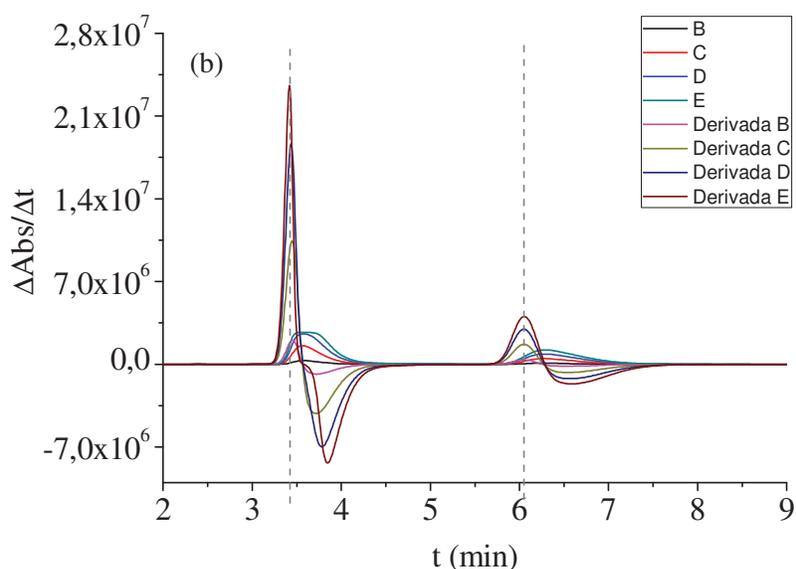


Figura 24. Cromatograma referente à mistura de (1) piperonal e (2) safrol. (a) Condições experimentais:  $Q = 1,0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ; Fase móvel: etanol/água; Coluna:  $25 \times 1,0 \text{ cm}$ ;  $V_{\text{injeção}} = 20 \text{ }\mu\text{L}$ ; Proporção: 50% de piperonal/50% de safrol; Temperatura =  $35^{\circ}\text{C}$ . (b) Derivada primeira referente aos dados experimentais:  $B = 2,0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ;  $C = 10,0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ;  $D = 15,0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ;  $E = 20,0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ .

Nas Figuras 21 a 24, na parte (b), a linha tracejada refere-se aos tempos de inflexão das frentes de adsorção das bandas cromatográficas do piperonal e safrol.

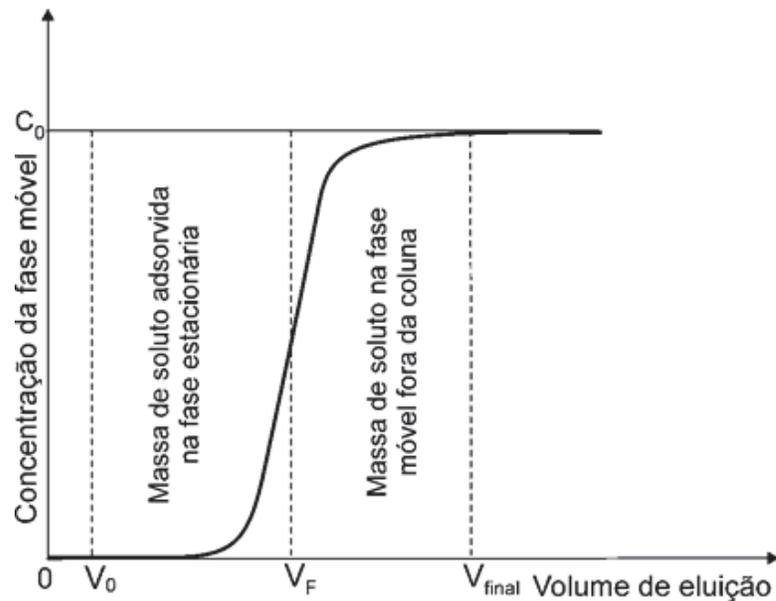
Outra maneira de realizar a sobrecarga da coluna é pela sobrecarga de volume, na qual se mantém a concentração constante e varia-se o volume.

# ANEXO A

## 1. Determinação das isotermas de adsorção por análise frontal

---

O método da análise frontal consiste em substituir em sucessivos passos, o fluxo da fase móvel que escoava através da coluna contendo o composto em estudo com concentrações cada vez maiores e o registro das curvas de ruptura na saída da coluna, conforme a Figura 25 (Gritti *et al.*, 2003).



**Figura 25.** Esquema de uma curva de ruptura (adaptado de Gritti *et al.*, 2003).

A conservação da massa do soluto entre os tempos quando a nova solução entra na coluna e quando o platô é alcançado permite o cálculo da quantidade adsorvida,  $q$ , de soluto na fase estacionária em equilíbrio com uma dada concentração,  $c_0$ , na fase móvel. A área na Figura 25 representa esta quantidade, que pode ser obtida também pela integração da área sob a curva. A quantidade adsorvida,  $q$ , é dada por:

$$q_j = \frac{c_{0,j}(V_{Fj} - V_0)}{V_{ads}} \quad (12)$$

em que  $V_F$ ,  $V_0$  e  $V_{ads}$  são o volume de retenção no ponto de inflexão, volume morto do sistema e o volume da fase estacionária, respectivamente (**Gritti et al., 2003**).

Para mistura binária, a curva de ruptura possui um platô intermediário na etapa de adsorção. Quando o sistema atingir o equilíbrio, o componente de menor afinidade é eluído a partir deste platô intermediário. Os dados experimentais da isoterma podem ser determinados de acordo com o balanço de massa representado pela Equação (13) (**Mihlbachler et al., 2002; Lisec et al., 2001**):

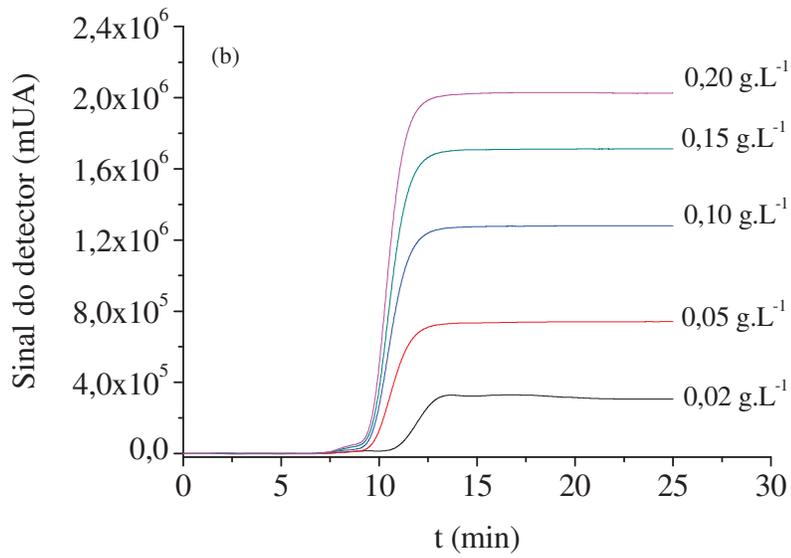
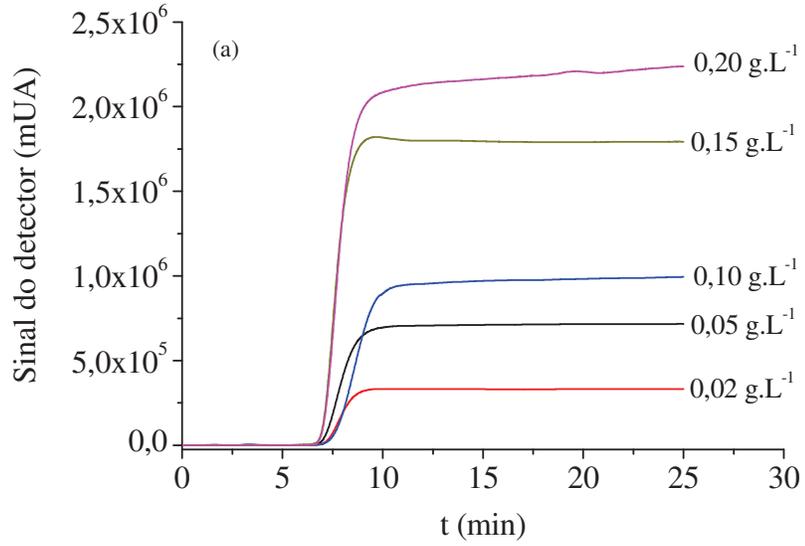
$$q_j = \frac{c_{0,j}(V_{F_{1+2}} - V_0) - c_{pt,j}(V_{F_{1+2}} - V_{F_1})}{V_{ads}} \quad (13)$$

onde  $c_{0,j}$  e  $c_{pt,j}$  são as concentrações do componente  $j$  na alimentação e no platô intermediário, respectivamente;  $V_{F_1}$  e  $V_{F_{1+2}}$  são os volume de retenção no primeiro e no segundo ponto de inflexão na etapa de adsorção da curva de ruptura;  $V_0$  é o volume morto;  $V_{ads}$  é o volume do adsorvente.

## 2. RESULTADOS PARA ISOTERMA LINEAR

A cada curva de ruptura da Figura 26 foi aplicada a derivada primeira para obter o tempo de inflexão. O tempo de inflexão, por sua vez, foi substituído na Equação (12) para se determinar a concentração ( $q$ ) de cada componente na fase estacionária. O coeficiente angular da reta de  $q$  versus  $c$  é a constante de equilíbrio ( $k_p$ ), comumente chamada de

constante modificada de Henry. Os valores das constantes bem como os coeficientes de determinação são mostrados na Tabela 19.



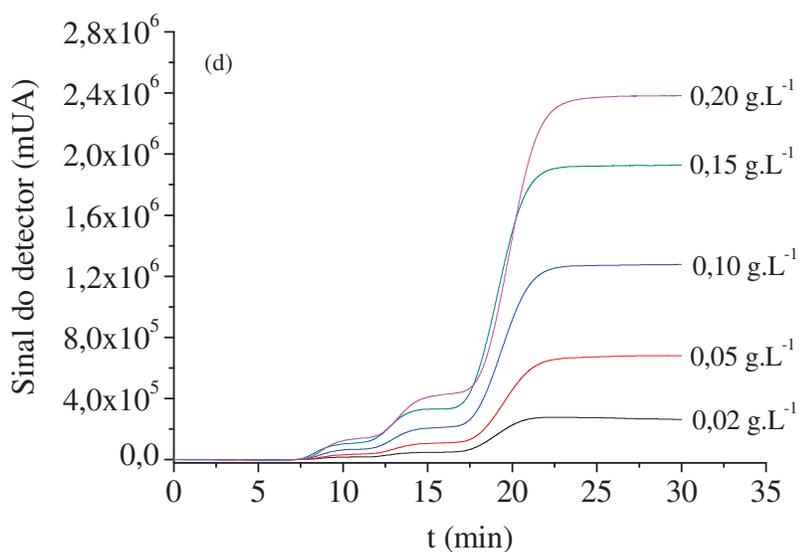
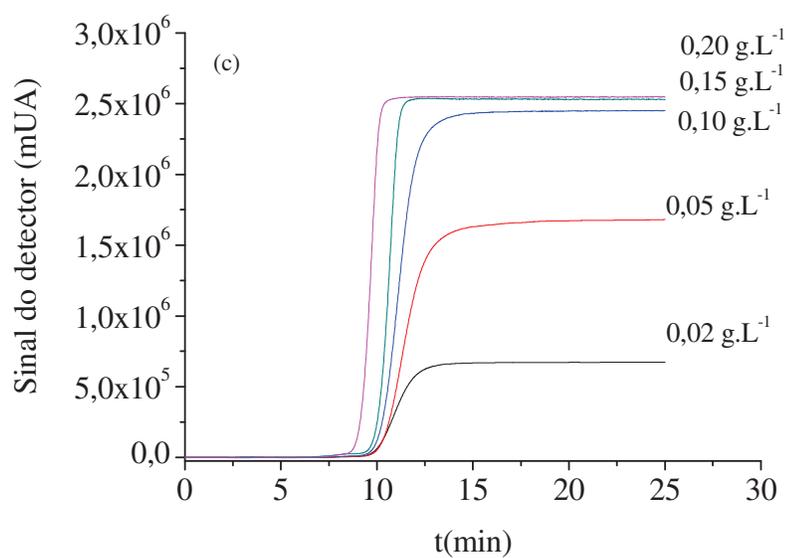


Figura 26. Curvas de ruptura do (a) piperonal, (b) safrol, (c) isosafrol, (d) terpinoleno. Condições experimentais:  $Q = 1,0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ; Temperatura =  $25^\circ\text{C}$ , Fase móvel: acetonitrila/água; Coluna:  $15 \times 0,39 \text{ cm}$ ; Fase estacionária =  $\text{C}_{18}$ , Detecção UV =  $245 \text{ nm}$ .

Tabela 19. Constante de equilíbrio e coeficiente de determinação

	H	R <sup>2</sup>
Piperonal	3,695	0,9863
Safrol	5,432	0,9991
Isosafrol	5,375	0,9806
Terpinoleno	11,426	0,9990

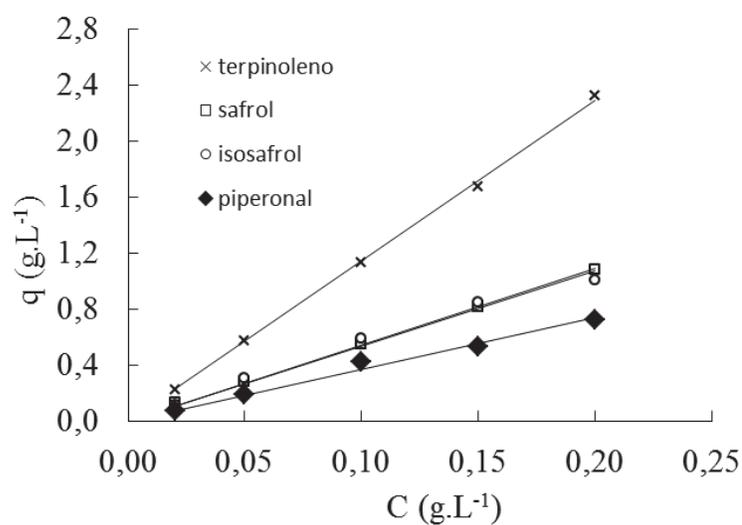


Figura 27. Ajuste linear na obtenção das constantes de equilíbrio. Condições experimentais:  $Q = 1,0 \text{ mL.min}^{-1}$ ; Temperatura =  $25^{\circ}\text{C}$ ; Fase móvel: acetonitrila/água; Coluna:  $15 \times 0,39 \text{ cm}$ ; Fase estacionária:  $\text{C}_{18}$ .