



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

FELIPE COELHO VIEIRA

**DESENVOLVIMENTO DE PROCESSOS CROMATOGRÁFICOS  
EMPREGANDO ENSAIOS DE TRIAGEM E MODELAGEM  
FENOMENOLÓGICA**

São Carlos, SP

2024

FELIPE COELHO VIEIRA

**DESENVOLVIMENTO DE PROCESSOS CROMATOGRÁFICOS  
EMPREGANDO ENSAIOS DE TRIAGEM E MODELAGEM  
FENOMENOLÓGICA**

*Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de São Carlos para a obtenção do título de Doutor em Engenharia Química.*

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Perencin de Arruda Ribeiro

Coorientador: Prof. Dr. Thiago Faggion de Pádua

São Carlos, SP

2024

Vieira, Felipe Coelho

Desenvolvimento de processos cromatográficos empregando ensaios de triagem e modelagem fenomenológica / Felipe Coelho Vieira -- 2024. 143f.

Tese de Doutorado - Universidade Federal de São Carlos, campus São Carlos, São Carlos

Orientador (a): Marcelo Perencin de Arruda, Ribeiro

Banca Examinadora: Marcelo Perencin de Arruda

Ribeiro, Viviane Maimoni Gonçalves, Leandro Junqueira

Benedini, Antonio Jose Gonçalves da Cruz, Charles

Dayan Farias de Jesus

Bibliografia

1. Cromatografia líquida. 2. Desenvolvimento de métodos de purificação. 3. Estimação de parâmetros. I. Vieira, Felipe Coelho. II. Título.

Ficha catalográfica desenvolvida pela Secretaria Geral de Informática (SIn)

DADOS FORNECIDOS PELO AUTOR

Bibliotecário responsável: Arildo Martins - CRB/8 7180



# UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia  
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química

---

## Folha de Aprovação

---

Defesa de Tese de Doutorado do candidato Felipe Coelho Vieira, realizada em 30/07/2024.

### Comissão Julgadora:

Prof. Dr. Marcelo Perencin de Arruda Ribeiro (UFSCar)

Profa. Dra. Viviane Maimoni Gonçalves (IBSP)

Prof. Dr. Leandro Junqueira Benedini (IFSP)

Prof. Dr. Antonio Jose Gonçalves da Cruz (UFSCar)

Prof. Dr. Charles Dayan Farias de Jesus (UFSCar)

O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química.

## **APOIO FINANCEIRO**

Esta pesquisa foi financiada pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) no projeto PIPE-FAPESP 2018/08369-7 e UFSCar 23.112 – ProEx nº 000630/2019-31, e pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), código de processo: 88887.503155/2020-0 e 001.

## AGRADECIMENTOS

Gostaria de expressar minha profunda gratidão a todos que me apoiaram ao longo desta jornada de aprendizado. A orientação e sabedoria dos meus orientadores, Marcelo e Thiago, foram de suma importância. Suas contribuições e conselhos valiosos guiaram o desenvolvimento desta pesquisa, e sou imensamente grato pela dedicação de ambos. Vou levar vocês para a vida, com todos os conselhos e a amizade.

Agradeço ao pessoal da Kopp Technologies por confiar no meu trabalho. O Willian e o Maicon nunca mediram esforços para me ajudar nesta etapa de aprendizado.

Especialmente, agradeço à minha esposa, Jussara, por seu amor, paciência e apoio incondicional. Sua compreensão e encorajamento foram fundamentais para que eu pudesse me dedicar integralmente a este trabalho.

À minha família, que sempre acreditou em mim e me proporcionou todo o suporte necessário para alcançar meus objetivos, deixo aqui meu mais sincero agradecimento. Aos meus pais, Raimundo e Maria Aparecida, pelo carinho e por sempre me inspirarem a seguir adiante. À minha irmã, Ana Cristina, pelo apoio e incentivo constantes, e por estar sempre ao meu lado nos momentos mais difíceis.

Agradeço também aos meus amigos, Fábio, Leandro, Lucas, Gabriel, Vinicius, Carol e Igor, que estiveram presentes em muitos momentos desta jornada (maior parte da Pandemia), oferecendo apoio, conversas e ensinando a programar.

Aos orientandos do Marcelo, que estiveram ao meu lado nos momentos de dificuldades e alegrias, e que sempre me motivaram a continuar, meu muito obrigado. A presença de vocês tornou esta caminhada muito mais agradável e significativa. Em especial à Maria Carlota, um exemplo de luta, levarei para a vida sua perseverança e conselhos.

A todos vocês, deixo aqui meu eterno agradecimento.

## **APRESENTAÇÃO**

Este doutorado integra um projeto de pesquisa colaborativo entre grupos do Departamento de Engenharia Química da UFSCar e a Kopp Technologies, uma empresa de biotecnologia especializada no desenvolvimento de materiais e soluções industriais para separações de biomoléculas por cromatografia.

## RESUMO

Modelos fenomenológicos são ferramentas valiosas para a simulação de colunas cromatográficas, mas sua aplicação é dificultada pela complexidade teórica e pela obtenção dos parâmetros. Geralmente, condições como escolha de resinas, fase móvel e modificadores são definidas por protocolos de triagem, cujos dados raramente são utilizados para estimar os parâmetros dos modelos de coluna. Neste trabalho, propõe-se um procedimento de estimação conjunta para obter os parâmetros de modelagem de colunas operando com eluição gradiente, integrando dados de triagem em microplacas com um único experimento em coluna. Inicialmente, os parâmetros da isoterma de equilíbrio são estimados a partir dos dados de triagem e, posteriormente, refinados com informações do cromatograma da coluna, permitindo também a estimação dos parâmetros de transporte de massa. O método foi testado em cromatografia de fase reversa, utilizando um surfactante não iônico e sílica funcionalizada. Enquanto os parâmetros de equilíbrio obtidos somente a partir dos dados de microplacas apresentaram um desvio de 8,9% em relação ao volume de retenção experimental, a abordagem conjunta, que incorpora a curva L, reduziu esse desvio para apenas 0,8%. Esses resultados demonstram que a integração dos dados de triagem com a curva L minimiza o sobreajuste do modelo, mesmo com um único ensaio de coluna, contribuindo para acelerar o desenvolvimento do processo e reduzir o consumo de insumos.

## ABSTRACT

Phenomenological models are valuable tools for developing chromatography methods. However, its applicability is impaired by the theoretical complexity and accessibility to model parameters. Despite materials are usually select by screening protocols, data obtained during this phase are not used further in the development of the purification process. Here, a joint estimation procedure that integrates data from microplate screening with a single column experiment was proposed to estimate equilibrium and dispersion parameters for modeling gradient elution. Initial estimates of equilibrium isotherm parameters were derived from the screening data, which were then refined by incorporating column chromatogram data to estimate mass transport parameters and enhance isotherm predictions. The proposed method was validated with a reverse phase chromatography using a non-ionic surfactant and functionalized silica. The equilibrium parameters estimated with microplate data predicted a retention volume 8.9% far from experimental results, while the joint estimation prediction was 0.8% in the best-case scenario. In this case, results show that the use of screening data combined with an L-curve method effectively mitigated model overfitting, even when relying on a single gradient elution column assay. The presented protocol should speed up the process development and reduce the consumption of inputs with column experiments.

# SUMÁRIO

<b><u>LISTA DE FIGURAS.....</u></b>	<b>13</b>
<b><u>LISTA DE TABELAS.....</u></b>	<b>16</b>
<b><u>1. INTRODUÇÃO E MOTIVAÇÃO .....</u></b>	<b>17</b>
<b><u>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</u></b>	<b>21</b>
<b>2.1. Bioprodutos.....</b>	<b>21</b>
<b>2.2. Purificação de bioprodutos.....</b>	<b>22</b>
<b>2.3. Processos cromatográficos para purificação de proteínas .....</b>	<b>23</b>
2.3.1. Seleção da fase móvel .....	24
2.3.2. Seleção da fase estacionária .....	28
<b>2.4. Desenvolvimento de métodos cromatográficos.....</b>	<b>33</b>
2.4.1. Miniaturização e HTPD no desenvolvimento de métodos cromatográficos 34	
<b>2.5. Predição do tempo de retenção em cromatografia líquida.....</b>	<b>38</b>
2.5.1. Modelo de força do solvente linear (LSS) .....	40
2.5.2. Modelo de interação eletrostática e hidrofóbica (MPM) .....	42
2.5.3. Modelo de equilíbrio de associação .....	43
2.5.4. Modelos matemáticos para previsão da retenção.....	46
<b>2.6. Principais modelos fenomenológicos para cromatografia preparativa.....</b>	<b>48</b>
2.6.1. Definições importantes para modelagem fenomenológica .....	51
2.6.2. Modelo ideal (IM) .....	52
2.6.3. Modelo equilíbrio dispersivo (EDM).....	55
2.6.4. Modelos cinéticos agrupados (LKM).....	56
2.6.5. Modelo geral de taxa (GRM) .....	57
<b>2.7. Solução matemática dos modelos fenomenológicos para simulação de     colunas cromatográficas.....</b>	<b>59</b>
2.7.1. Condições de contorno para entrada e saída da coluna.....	60
<b>2.8. Estimação de parâmetros cromatográficos.....</b>	<b>61</b>
2.8.1. Estimação por mínimos quadrados .....	66
2.8.2. Estimação de parâmetros empregando dados experimentais em batelada	66
2.8.3. Estimação de parâmetros a partir de experimentos em coluna .....	68
<b><u>3. METODOLOGIA.....</u></b>	<b>70</b>
<b>3.1. Simulador para o desenvolvimento de métodos cromatográficos.....</b>	<b>71</b>

3.1.1. Solução matemática dos modelos fenomenológicos para simulação de colunas cromatográficas.....	72
3.1.2. Índice de Convergência da malha (GCI) e a instabilidade numérica.....	72
3.1.3. Modelo para o modificador da fase móvel.....	74
<b>3.2. Plataforma de estimação conjunta.....</b>	<b>77</b>
3.2.1. Materiais.....	77
3.2.2. Procedimentos experimentais.....	78
3.2.3. Modelos Matemáticos .....	81
<b><u>4. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....</u></b>	<b><u>85</u></b>
<b>4.1. Croma Dash: O software desenvolvido para simulação e estimação de parâmetros cromatográficos.....</b>	<b>85</b>
4.1.1. Tratamento dos dados em batelada e estimação dos parâmetros (CromaD_BEP).....	86
4.1.2. Tratamento dos dados em coluna (CromaD_CEP).....	87
4.1.3. Simulador de coluna e seus modelos fenomenológicos implementados (CromaD_S).....	87
4.1.4. Estimação conjunta ou clássica (CromaD_E).....	88
<b>4.2. Análise dos solucionadores numéricos implementados (Simuladores) ....</b>	<b>89</b>
4.2.1. Escolha do melhor esquemas de face para EDM de um único componente	91
4.2.2. Influência da modelagem da concentração do solvente na coluna .....	95
4.2.3. Influência das isotermas de equilíbrio e da condição de contorno.....	97
<b>4.3. Dados das placas: seleção de resina e detecção de outliers.....</b>	<b>98</b>
<b>4.4. Estimação de parâmetros por meio de experimentos em microplacas....</b>	<b>100</b>
<b>4.5. Estimativa conjunta: Re-estimação de parâmetros empregando dados de coluna de cromatografia combinados com triagem em microplacas .....</b>	<b>104</b>
<b><u>5. CONCLUSÃO.....</u></b>	<b><u>108</u></b>
<b><u>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</u></b>	<b><u>110</u></b>
<b><u>Lista de Símbolos.....</u></b>	<b><u>124</u></b>
<b><u>Lista de Abreviações.....</u></b>	<b><u>127</u></b>
<b><u>Apêndice A – Predição da retenção de componentes em colunas cromatográficas ..I</u></b>	
<b>A.1. Análise do fator de retenção para eluição isocrática .....</b>	<b>I</b>
<b><u>Apêndice B – Modelos fenomenológicos.....</u></b>	<b><u>III</u></b>
<b>B.1. Modelos fenomenológicos de uma equação.....</b>	<b>III</b>
B.1.1. Balanço de massa para modelos de uma equação .....	III

B.1.2. Solução das equações diferenciais parciais por volumes finitos para os modelos cinéticos agrupados (LKM) e reativo-dispersivo de múltiplos componentes..... VII

B.1.3. Solução das equações diferenciais parciais por volumes finitos para os modelos cinéticos agrupados (LKM) e reativo-dispersivo de um único componente ..... IX

B.1.4. Solução das equações diferenciais parciais por volumes finitos para o modelo equilíbrio dispersivo (EDM) de múltiplos componentes acoplado ao modelo LSS.....X

B.1.5. Solução das equações diferenciais parciais por volumes finitos para o modelo equilíbrio dispersivo (EDM) de um único componente acoplado ao modelo LSS..... XIV

**B.2. Modelagem da concentração de solvente na coluna, adimensionalização. XVI**

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Modos de operação cromatográfica. (a) superfície planar: 1-câmara, 2- fase estacionária, 3-frente do solvente, 4 - fase móvel. (b) Em coluna: a fase móvel, onde também ocorre a injeção (1), fase estacionária (2), componente 1 (3) e componente 2 (4). ..... 23
- Figura 2** – Representação hipotética dos efeitos das eluição isocrática e por gradiente em degrau nos picos cromatográficos. As letras A e B correspondem a solução tamponante e um solvente, respectivamente. C1 e C2 são as siglas dos dois componentes. .... 25
- Figura 3** - Representação hipotética dos efeitos das eluição por gradientes em degrau e linear nos picos cromatográficos. As letras A e B correspondem a solução tamponante e um solvente, respectivamente. C1 e C2 são as siglas dos dois componentes. .... 27
- Figura 4** - Diferentes interações dos componentes químicos e a fase estacionária. Equilíbrio (E), Injeção da amostra (I), Eluição 1 (E1), Eluição 2 (E2) e Limpeza da coluna (L) são as etapas cromatográficas. Formas geométricas irregulares coloridas correspondem as moléculas. A intensidade das cores está relacionada com a capacidade de interação das moléculas com a fase estacionária, mais clara menor capacidade e mais escuras com maior capacidade. Círculos com contorno vermelhos ou verdes são moléculas ou misturas indesejadas no processo..... 29
- Figura 5** - Exemplos dos principais tipos de miniaturização. a) microplacas, b) microchips e c) minicolunas ou ponteiras de micropipetas de titulação. .... 35
- Figura 6** – Propriedades geométricas do pico cromatográfico perfeito (Gaussiano). ... 38
- Figura 7** - Representação da ligação de moléculas grandes a uma superfície catiônica. Círculo positivo azul: cargas na superfície sólida, Verde: sitio “livre” para troca do sal com uma carga da molécula, Rosa: sitio da molécula ligada a superfície sólida e Vermelho: Sitio indisponível para troca, contendo íons ligado. Adaptado (GALLANT; KUNDU; CRAMER, 1995; MELANDER; EL RASSI; HORVÁTH, 1989)..... 46
- Figura 8** - Escoamento da fase móvel no leito empacotado: (a) escoamento intersticial, (b) escoamento no poro e (c) escoamento total, interstício e poro (quando o leito é considerado um monolito) ..... 49
- Figura 9** – Metodologias usualmente aplicadas para estimação de parâmetros cromatográficos. .... 63
- Figura 10** - Procedimento comumente empregado para estimação de parâmetros por meio de dados obtidos em experimentos em batelada..... 65
- Figura 11**- Diagrama de fluxo da metodologia proposta que resume os passos para estimar os parâmetros. .... 70
- Figura 12** - Comportamento de um solvente, mistura de solventes ou sal dentro da coluna, (a) o perfil do modificador de fase que entra na coluna (vermelho e cercado em pontilhado), vai ser o mesmo na região interna à coluna (verde), porém deslocado no tempo. (b)  $\phi$  em função do tempo para secção de entrada da coluna; a concentração do modificador injetado na coluna depende do tempo que começa ( $tG, inj$ ) e termina ( $tG, fin$ ) o gradiente..... 75

<b>Figura 13</b> – Esquema experimental dos ensaios com placas de 96 poços para obtenção dos dados de isoterma de adsorção.....	78
<b>Figura 14</b> - Passo a passo do procedimento experimental de adsorção das microplacas. ....	79
<b>Figura 15</b> - Desenho esquemático da coluna flash .....	80
<b>Figura 16</b> - Eluição por gradiente do experimento com NP40. No eixo y, a variação da concentração de SOL é representada (v/v) % e no eixo x o volume total de eluição. ....	81
<b>Figura 17</b> - Estrutura do Cromo Dash .....	85
<b>Figura 18</b> – Resposta numérica de cromatograma para a concentração de saída da coluna em função do volume acumulado de solvente com simulações utilizando distintos integradores (a legenda indica o tempo necessário para simular o sistema) .....	90
<b>Figura 19</b> - Variação da largura da base ( $w_b$ ) do pico ao final da coluna simulado em função do número de nós da malha para diferentes métodos de discretização da face.....	91
<b>Figura 20</b> – Tempo que leva para obter a resposta simulada dos solucionadores com distintos esquemas de interpolação de face para concentração em função do número de nós da malha. ....	92
<b>Figura 21</b> – O tempo de simulação alterando o $NC$ ( $\Delta t_{max}$ ) para distintos esquemas de interpolação de face .....	94
<b>Figura 22</b> - Influencia da dispersão aparente ( $Da = 0,01\text{cm}^2/\text{min}$ ) na discretização da face Koren e kappa .....	95
<b>Figura 23</b> - Influência da modelagem do solvente na coluna, linha vermelha corresponde a concentração uniforme (constante) na coluna, $\phi(t)$ , e linha azul para concentração variável ao longo da coluna, $\phi(t, z)$ .....	96
<b>Figura 24</b> – Efeitos dos parâmetros na altura do pico, no volume de retenção e no tempo de simulação para $\phi(t, z)$ variável. ....	97
<b>Figura 25</b> - Comparação da isoterma Langmuir e linear e a condições de contornos Pulso retangular e Danckwerts. ....	97
<b>Figura 26</b> - Concentração experimental no líquido ( $CL_{exp}$ ) para placas P1 (10 mg), P2 (15 mg), P3 (25 mg) e P4 (50 mg) para solução NP40 com diferentes concentrações de etanol ( $\phi_1$ , $\phi_2$ , $\phi_3$ ) e todas as resinas. Cores mais próximas do branco indicam concentrações mais baixas e verdes escuras concentrações mais altas.....	99
<b>Figura 27</b> – Estrutura molecular do 4-Nonilfenol dietoxilado (NP-40) .....	99
<b>Figura 28</b> - Critérios de exclusão dos dados experimentais, supondo que os dados tenham uma distribuição normal. ....	100
<b>Figura 29</b> - Resultados de ajuste para a estimativa de parâmetros a partir de dados de microplacas. (a) e (b) mostram a previsão da isoterma de equilíbrio usando os parâmetros estimados com base nas abordagens dos q-residuais e C-residuais, respectivamente. As linhas pontilhadas correspondem ao intervalo de confiança de 95% da previsão do modelo.....	101
<b>Figura 30</b> - Dispersão média de dados e seu intervalo de confiança de 95% para as duas abordagens diferentes de estimativa de parâmetros de isoterma, A (a) e B (b). ..	102

- Figura 31** - Simulações cromatográficas empregando os parâmetros estimados pelas abordagens dos q-residuais (a) e C-residuais (b). O cromatograma experimental (Exp) já está corrigido pelos volumes Dwell e Dead. A curva de gradiente (Grad) está relacionada à escala do eixo y a direita. Os volumes de retenção experimental ( $V_{r,e}$ ) e simulado ( $V_{r,s}$ ) também são mostrados. .... 103
- Figura 32** – Re-estimações pelo método inverso (aplicando MQC) empregando o EDM/LSS. (a) Modelo de cromatograma usando os parâmetros de estimativa inicial que foram estimados em microplacas (Modelo), o parâmetro único ( $\theta = Da$ ) reestimado (1P) e os quatro parâmetros ( $\theta = Da, b_0, S$  e  $qs$ ) reestimados (4P). Todos foram comparados com o cromatograma experimental (Exp). Na linha pontilhada (Modelo +95%IC), o erro dos parâmetros estimados em batelada foi propagado no simulado (EDM/LSS); (b) Os parâmetros reestimados ( $CL_{mod} \phi_1, \phi_2$  e  $\phi_3$  4P) foram comparados com os estimados na abordagem dos C-residuais pelas Equações 66 e 67. Os dados experimentais foram coloridos para corresponder às cores usadas nos modelos, indicando a concentração do modificador de cada ponto. .... 104
- Figura 33** - Estimativa conjunta dos parâmetros de cromatografia usando a função objetiva WLS: (a) Picos simulados dos parâmetros reestimados variando  $\sigma^2$  (parâmetro de ajuste da função objetiva). Para  $\sigma^2 = 0,0032$  (MQP  $\sigma^2 = 0,0032$ ),  $\sigma^2 = 0,5$  (MQP  $\sigma^2 = 0,5$ ),  $\sigma^2 = 5$  (MQP  $\sigma^2 = 5$ ) e comparado com a estimativa somente de  $Da$  (1P, função objetiva MPC); (b) Curva L: variação do valor da função de custo (WLS) para diferentes valores de  $\sigma^2$ ; (c) modelo em microplacas utilizando os parâmetros re-estimados para diferentes parâmetros de ajuste. A seta indica a interceptação da linha, o melhor valor para o parâmetro  $\sigma^2$ . .... 106

**LISTA DE TABELAS**

<b>Tabela 1</b> - Limitadores de fluxo para os métodos TVD .....	60
<b>Tabela 2</b> - Condições experimentais cromatográficas empregadas para simular a eluição do NP40. ....	81
<b>Tabela 3</b> - Valores das variáveis utilizadas para as simulações de estabilidade numérica .....	90
<b>Tabela 4</b> - GCI calculado para dois limitadores de fluxo diferentes, kappa e Koren. ...	93
<b>Tabela 5</b> - Os valores dos parâmetros estimados pelas abordagens dos q-residuais (Figura 29a) e C-residuais (Figura 29b) e o erro padrão (EP) de cada parâmetro.	101
<b>Tabela 6</b> – Valores dos parâmetros estimados e re-estimados. MQC: (re-estimativa a partir de experimentos em coluna) e MQP: re-estimados empregando a estimação conjunta com parâmetro de ajuste $\sigma^2$ ) e o erro padrão (EP) de cada parâmetro.	107

## 1. INTRODUÇÃO E MOTIVAÇÃO

A cromatografia é amplamente utilizada nos setores farmacêutico, alimentícios e de química fina, frequentemente representando a etapa operacional mais crítica (GRITTI, 2021; RISCHAWY *et al.*, 2019). A concorrência no setor pressiona as empresas a desenvolver bioprodutos o mais rápido possível, mantendo os mais altos padrões de qualidade (HUUK *et al.*, 2016; RISCHAWY *et al.*, 2019).

O desenvolvimento de separações cromatográficas é geralmente considerado um desafio devido à ampla gama de resinas, tipos de eluição e modificadores de fase (tais como sais, solventes orgânicos, ...), bem como suas concentrações. Todos esses fatores precisam ser cuidadosamente definidos para manter a pureza desejada e a recuperação da molécula, sem perder de vista a produtividade. É importante notar que a configuração ideal é extremamente sensível à interação entre a molécula e o ligante (GONZÁLEZ-GONZÁLEZ; RITO-PALOMARES, 2022; LIETTA *et al.*, 2022), portanto, alcançá-la é um processo que exige tempo e depende da coleta de uma vasta quantidade de dados experimentais. A fim de reduzir o tempo necessário para encontrar configurações recomendáveis, a miniaturização e os métodos de triagem de alto desempenho podem ser aplicados (HUBBUCH, 2012; HUUK *et al.*, 2016; ŁACKI, 2012).

A eluição por gradiente é comumente recomendada para preservar uma alta resolução, ao mesmo tempo em que mantém um tempo viável de eluição. Isso contribui para a redução do uso de solventes (BLUMBERG, 2014a; DE LUCA *et al.*, 2020; POOLE; ATAPATTU, 2020) e para separações mais eficientes (BLUMBERG, 2014b).

A capacidade de prever o tempo de retenção de uma molécula dentro da coluna é essencial para o desenvolvimento de processos cromatográficos (ÅSBERG *et al.*, 2013; GRITTI, 2021; GUIOCHON *et al.*, 2006). No contexto da eluição por gradiente, a retenção da molécula é altamente sensível à concentração do modificador da fase móvel (ÅSBERG *et al.*, 2013; GRITTI, 2021; GUIOCHON *et al.*, 2006; JANDERA; KUČEROVÁ; URBAN, 2011). Assim, torna-se imprescindível a elaboração de um modelo que represente de maneira eficaz a forma como o modificador impacta o tempo de retenção. Isso, por sua vez, acarreta um aumento na complexidade do modelo do processo, especialmente no que se refere à quantidade de parâmetros envolvidos.

Após a seleção de combinação(ões) adequada(s) de resina e modificadores de fase, a definição de variáveis de processo se faz necessária. Neste estágio, duas estratégias

podem ser adotadas. A primeira, de natureza empírica, utiliza o planejamento fatorial e análise de superfícies de resposta, enquanto a segunda, de caráter fenomenológico, recorre à modelagem mecanística (RISCHAWY *et al.*, 2019; STABY; RATHORE; AHUJA, 2017).

A abordagem empírica, apesar de eficaz, exige muito tempo e uma grande quantidade de insumos. Essa abordagem, além de não auxiliar na compreensão mais aprofundada do processo, não permite extrapolações, o que impossibilita adaptações ou alterações no processo (RISCHAWY *et al.*, 2019; STABY; RATHORE; AHUJA, 2017). Por outro lado, a abordagem fenomenológica supera tais limitações, uma vez que os parâmetros mecanísticos oferecem informações mais robustas sobre o sistema, e a princípio podem ser extrapolados, permitindo a adaptação contínua do processo. Esta última estratégia vem ganhando cada vez mais destaque no setor, especialmente no que diz respeito ao consumo de tempo e material durante as definições do processo (HAHN *et al.*, 2016).

Os modelos fenomenológicos são frequentemente propostos como alternativa para desenvolvimento, otimização e controle de processos cromatográficos (ÅSBERG *et al.*, 2013; BRHANE; QAMAR; SEIDEL-MORGENSTERN, 2019; FORSSÉN; ARNELL; FORNSTEDT, 2006; GUIOCHON *et al.*, 2006; HAHN *et al.*, 2016; HØRSHOLT *et al.*, 2019; HORSHOLT *et al.*, 2019; LIETTA *et al.*, 2022; ROCH *et al.*, 2019; WANG, Gang; HAHN; HUBBUCH, 2016). Embora esses modelos ofereçam diversas vantagens, a necessidade de se obter uma inferência precisa dos parâmetros de adsorção e transporte de massa através da aplicação de modelos fenomenológicos representa um desafio considerável (GUIOCHON *et al.*, 2006; LIETTA *et al.*, 2022). Superar a incerteza substancial associada aos parâmetros é uma tarefa complexa, o que pode comprometer a confiabilidade do modelo em situações de extrapolação. Vale ressaltar que a incerteza dos parâmetros é influenciada por diversos fatores, tais como a complexidade do modelo selecionado, as condições experimentais e do método utilizado para a estimativa dos parâmetros (LÓPEZ C. *et al.*, 2015; RISCHAWY *et al.*, 2019).

A aplicação de modelos fenomenológicos facilita o desenvolvimento de processos de purificação de moléculas em misturas altamente complexas, com pouco ou nenhum conhecimento prévio da composição (BENEDINI *et al.*, 2020; HAHN *et al.*, 2016). Embora este método seja mais eficiente em termos de tempo e material, ele está sujeito a uma alta correlação paramétrica (OSBERGHAUS *et al.*, 2012a; RISCHAWY *et al.*,

2019), o que aumenta a incerteza dos parâmetros e compromete a confiabilidade do modelo em extrapolações.

Em geral, a determinação dos parâmetros da isoterma de adsorção é realizada por meio de ensaios em coluna ou em batelada. A estratégia mais comum envolve o desenvolvimento de um processo em coluna, onde as curvas experimentais de ruptura são obtidas através da cromatografia de análise frontal (ÅSBERG *et al.*, 2013; BERNAU *et al.*, 2022; DE LUCA *et al.*, 2020; HAGHPANAH *et al.*, 2011; LIETTA *et al.*, 2022). Essa estratégia é amplamente adotada por especificar o número mínimo de testes de coluna necessários para estimar as isotermas durante o desenvolvimento de processos cromatográficos. No entanto, essa abordagem consome muito tempo e uma grande quantidade de insumos (BERNAU *et al.*, 2022; LIETTA *et al.*, 2022; POOLE; ATAPATTU, 2020; RAJENDRAN *et al.*, 2020). Uma alternativa é o chamado método inverso, em que os parâmetros são estimados a partir do cromatograma experimental utilizando um modelo fenomenológico (OSBERGHAUS *et al.*, 2012a). Esse método permite o desenvolvimento de processos de purificação de moléculas em misturas muito complexas com o mínimo de conhecimento a priori da composição (BENEDINI *et al.*, 2020; HAHN *et al.*, 2016). Embora este método seja mais eficiente em termos de tempo e custos, ele está sujeito à alta correlação paramétrica (OSBERGHAUS *et al.*, 2012a; RISCHAWY *et al.*, 2019), o que aumenta as incertezas dos parâmetros e compromete a confiabilidade do modelo em extrapolações, como por exemplo, ao aplicar uma otimização baseada em modelo para a eluição por gradiente.

Por outro lado, os experimentos em batelada estão se tornando cada vez mais difundidos, especialmente com as novas tecnologias de alto rendimento, *High-throughput* (ALTERN *et al.*, 2023; FIELD; KONSTANTINIDIS; VELAYUDHAN, 2017; LIETTA *et al.*, 2022; SHEKHAWAT *et al.*, 2023). O uso de microplacas para a realização de vários experimentos simultâneos em batelada permite a aquisição de uma grande quantidade de dados para estimar os parâmetros da isoterma de equilíbrio (BARKER *et al.*, 2015; HUUK *et al.*, 2016; LIETTA *et al.*, 2022). Na maioria dos casos, são considerados mais trabalhosos e fornecem menos informações do que os testes de coluna, entretanto, a grande quantidade de dados gerados (espaço amostral) e a redução no consumo de reagentes são fatores muito atraentes deste método (LIETTA *et al.*, 2022).

Os experimentos em microplacas são valiosos para gerar uma grande quantidade de dados com custos reduzidos. Esses dados geralmente apresentam grandes incertezas

(ruído), o que dificulta seu uso como informação quantitativa. Além de não serem capazes fornecer informações sobre os efeitos difusivos na coluna, que estão relacionadas principalmente à dispersão do pico em um cromatograma e devem ser estimadas a partir de ensaios de coluna.

Contudo, neste trabalho, um método para aplicar os dados de triagem de resinas foi proposto. Assim, os parâmetros para modelagem da operação por eluição gradiente em coluna foram obtidos utilizando os dados de placa e um único cromatograma. A ideia foi aproveitar os dados que já poderiam ser utilizados na própria triagem, ou seja, normalmente obtidos no desenvolvimento de processos de separação. Deste modo, foi possível obter resultados de ajuste paramétrico mesmo com os dados ruidosos característicos da triagem com as placas e evitando o sobreajuste do método inverso.

Uma ferramenta computacional, implementada em Python foi criada para auxiliar no desenvolvimento de processos cromatográficos. O protocolo proposto é justificado usando o surfactante 4-Nonilfenol dietoxilado (NP-40) como molécula modelo. Os dados foram gerados durante o projeto PIPE Fapesp 2018/08369-7, finalizado em 2021.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Bioprodutos

Bioprodutos abrangem uma diversa classe de bens que vão desde pequenas biomoléculas (antibióticos, açúcares e aminoácido) até proteínas, hormônios ou mesmo organelas (HARRISON *et al.*, 2015). Tais produtos tem sido um importante fator de crescimento para a indústria, além de contribuírem com o aumento da qualidade e expectativa de vida da população (GONZÁLEZ-GONZÁLEZ; RITO-PALOMARES, 2022).

No período de 2018-2022, 244 novos produtos farmacêuticos foram aprovados nos EUA, sendo 70 (29%) deles bioprodutos. Em comparação com o período de 2010-2014, a quantidade de biofármacos permitidos para comercialização triplicou (WALSH; WALSH, 2022). Já no Brasil, a categorias de medicamentos biológicos representava 23% do faturamento total da indústria farmacêutica em 2018 (VIEIRA; SANTOS, 2020).

Na produção dos bioprodutos, o avanço de técnicas de análise e controle das etapas de preparo do inóculo e cultivo celular (*bioprocess upstream*) possibilitaram aumentar a escala de pequenas quantidades de produtos para números significativamente maiores (HOUDE; BERKOWITZ, 2019; ŁACKI, 2014). Em geral, em processos *upstream*, o meio que contém o bioproduto de interesse é complexo, com diversas substâncias sem interesse comercial, consideradas contaminantes. Isso ocorre, principalmente quando uma biomolécula é produzida por rotas fermentativas. Quando necessário, o rompimento celular para liberação da biomolécula de interesse torna o meio ainda mais complexo e a separação difícil (HOUDE; BERKOWITZ, 2019; ŁACKI, 2014).

Com diversos contaminantes gerados pela etapa *upstream* (HOUDE; BERKOWITZ, 2019; ŁACKI, 2014), a etapa de separação e purificação dos produtos desejados, ou *bioprocess downstream*, é em si um tema complexo, julgado muitas vezes como o maior obstáculo para viabilidade econômica dos bioprocessos em escala industrial (HARRISON *et al.*, 2015; NFOR *et al.*, 2009).

As exigências de pureza para aplicações alimentícias e farmacêuticas tendem a ampliar ainda mais os custos de purificação, que pode envolver diversas etapas. Adicionalmente, sucessivas etapas para purificação podem expor o produto à deterioração e perda de atividade. As sucessivas etapas de purificação objetivam, ao final, a separação

dos demais componentes e aumento da concentração da molécula de interesse ou da atividade desejada (HARRISON *et al.*, 2015; NFOR *et al.*, 2008).

## 2.2. Purificação de bioprodutos

Processos *downstream* envolvendo a purificação de proteínas podem ser divididos em vários estágios: recuperação primária, recuperação intermediária e processos finais de purificação e formulação (HARRISON *et al.*, 2015; NFOR *et al.*, 2008; PETRIDES; COONEY; EVANSM, 1989). Se o produto é intracelular, o processo de separação se inicia com o rompimento celular. Também na etapa de recuperação primária a biomolécula alvo passa por processos de clarificação, em que são removidos sólidos insolúveis. Na etapa de recuperação intermediária estão incluídos processos de concentração e separação. Se o produto é solúvel, geralmente inicia-se a recuperação intermediária com processos de concentração. A concentração da molécula alvo pode ocorrer por diversas metodologias, tais como, a evaporação e a precipitação por adição de sais (*salting out*) (HARRISON *et al.*, 2015; NFOR *et al.*, 2008).

Processos finais de purificação e polimento dependem dos requerimentos de mercado. No caso de produtos de alta necessidade de pureza, os processos cromatográficos são predominantes, devido à alta capacidade de separação. Porém, usualmente são aplicados vários processos cromatográficos em sequência, ampliando a pureza de modo sequencial, iniciando com cromatografias de menor capacidade de retenção (capacidade de ligação molécula-adsorvato) e migrando para técnicas mais seletivas à medida que a pureza é maior. Já na formulação, o objetivo principal é obter o produto na forma desejada para distribuição (HARRISON *et al.*, 2015; NFOR *et al.*, 2008).

Algumas características dificultam a purificação dos bioprodutos, entre elas são comuns: a baixa concentração do produto alvo, a alta complexidade da mistura. Além da complexidade do meio, vários compostos possuem propriedades semelhantes as do produto de interesse, o que também implica em dificuldades de separação (HARRISON *et al.*, 2015; NFOR *et al.*, 2008).

Entre as dificuldades na definição dos processos de biosseparação, é importante destacar a possibilidade de combinação de diversas técnicas, que amplia a complexidade da síntese de processo. Além disso, em muitos casos, há uma caracterização incompleta

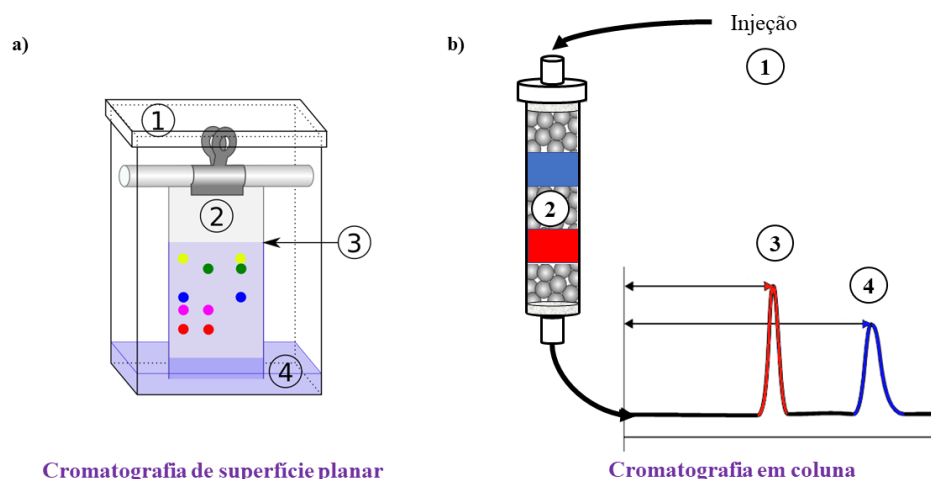
da mistura bruta que contém o produto alvo e falta de estudos em relação às propriedades físico-químicas do meio. Também se destaca a sensibilidade dos compostos, que pode inviabilizar a aplicação de técnicas clássicas de separação, como a destilação, devido à sensibilidade térmica. Bioprodutos também costumam apresentar sensibilidade ao pH e a substâncias químicas, como surfactantes e solventes orgânicos. De modo geral, durante a síntese de um processo de purificação para biomolécula, deve ser dada atenção aos contaminantes críticos, distinguindo os que devem ser removidos dos tolerados (HARRISON *et al.*, 2015; NFOR *et al.*, 2008).

### 2.3. Processos cromatográficos para purificação de proteínas

A cromatografia é um método de separação dos componentes de uma mistura, através da interação dos componentes em duas fases denominadas de fase móvel e estacionária. Os componentes químicos com maior afinidade pela fase estacionária se move através dela a uma velocidade menor (GUIOCHON *et al.*, 2006; JANSON, 2011).

Os modos mais comuns de um processo cromatográfico são em uma coluna de partículas depositas em leito fixo ou em uma superfície planar (MEYER, 2010). A Figura 1 apresenta um esquema dos dois modos de operação.

**Figura 1** - Modos de operação cromatográfica. (a) Superfície planar: 1-câmara, 2- fase estacionária, 3- frente do solvente, 4 - fase móvel. (b) Em coluna: a fase móvel, onde também ocorre a injeção (1), fase estacionária (2), componente 1 (3) e componente 2 (4).



Na cromatografia de camada delgada (Figura 1a), também conhecida como *Thin Layer Chromatography* (TLC), os componentes são retidos na camada delgada percorrendo distintos comprimentos enquanto eluidos pela passagem da fase móvel (4-

Figura 1a). Já na cromatografia em coluna, a passagem da fase móvel pelo leito ocorre de forma contínua até que os compostos sejam eluídos na fase móvel, como nos exemplos 3 e 4 da Figura 1b.

Para análise química (aplicações da química analítica) e preparativa (purificação), a configuração mais comum é a cromatografia em coluna, na qual a fase estacionária é compactada ou moldada, e onde a fase móvel (eluente) é bombeada pelo leito sólido (PRIMDAHL *et al.*, 2022). Além disso, também são comuns aplicações em fase sólida na forma de monolitos. Na cromatografia líquida, o estado físico da fase móvel é líquido e a da fase estacionária sólido (JANSON, 2011).

### **2.3.1. Seleção da fase móvel**

O componente de interesse ou as impurezas, geralmente, precisam interagir com uma fase estacionária para aumentar a eficiência da purificação (MEYER, 2010). As condições cromatográficas de adsorção podem ser diversas, variando, por exemplo, em força iônica, pH e aditivos, tais como, detergentes, sais, agentes redutores e metais (JANSON, 2011). Essas variações são facilmente obtidas alterando a composição da fase móvel, como por exemplo, adicionando uma concentração de solvente orgânico na solução tampão. A seleção da fase móvel geralmente segue alguns critérios (MEYER, 2010), tais como:

- baixa viscosidade, originando uma transferência de massa mais rápida e menor perda de carga;
- líquidos translúcidos, caso o meio de detecção for UV-vis, pois alguns solventes não são adequados do ponto de vista óptico;
- a pureza do solvente deve ser conhecida, impurezas podem afetar a separação ou a detecção;
- inerte, uma vez que a fase móvel não deve reagir com a amostra.
- toxidade, dado para cada finalidade a fase móvel não pode ser tóxica para sua amostra, comercialização, ou até mesmo no quesito segurança de trabalho.

Em determinadas situações, manter a composição da fase móvel constante (conhecida como eluição isocrática) não resulta em uma separação adequada. Nesses casos, torna-se necessário mudar para um tipo de eluição que modifica a composição da

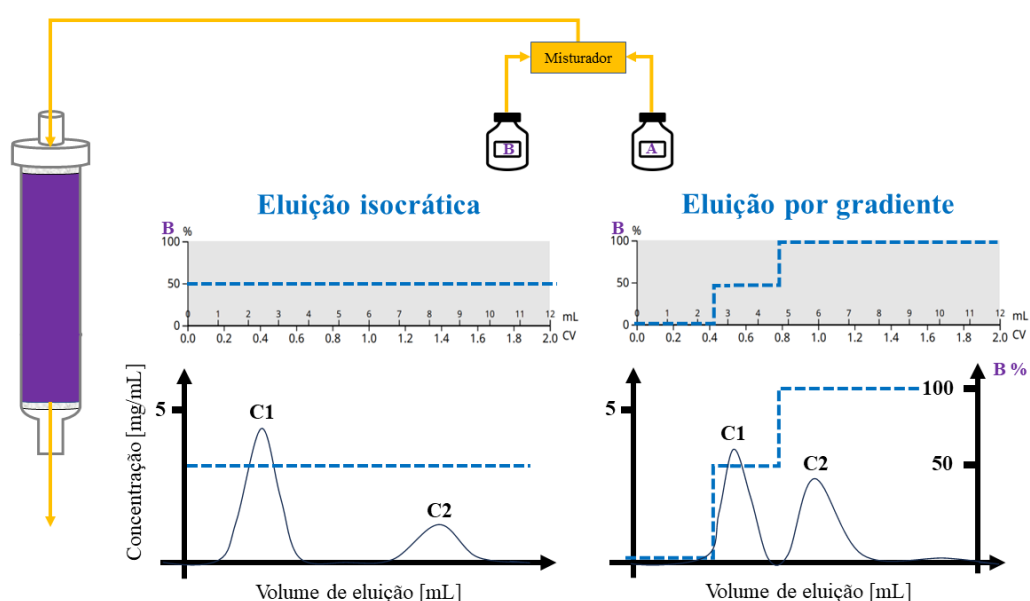
fase móvel durante o processo de separação. Essa operação é conhecida como eluição em gradiente (HARRISON *et al.*, 2015; SNYDER; DOLAN, 2007).

### 2.3.1.1. Eluição isocrática, por gradiente em degrau e linear

A eluição isocrática é amplamente aplicada na cromatografia, em especial, nos casos em que as propriedades de interação entre a molécula, a fase móvel e a fase estacionária são bem conhecidas (JANSON, 2011). Nesta eluição, os componentes se movem simultaneamente e moléculas que possuem maior interação com a fase estacionária tendem a permanecer mais tempo na coluna. Esse intervalo de tempo costuma ser contado desde a injeção até a detecção e maior retenção tende a alargar os picos, o que pode dificultar a separação destes componentes (GUIOCHON *et al.*, 2006; JANSON, 2011).

Para facilitar a introdução ao tema, considera-se a condições analíticas, em que o tempo de retenção está associado diretamente com a constante de equilíbrio (constante de proporcionalidade da lei de Henry). Misturas com componentes de diferentes volumes de retenção, ou seja, com uma ampla faixa de valores de constantes de equilíbrio, tem uma separação facilitada na cromatografia (POOLE; ATAPATTU, 2020). No exemplo da Figura 2, a eluição isocrática permite uma separação facilitada, pico de C1 distante de C2.

**Figura 2** – Representação hipotética dos efeitos das eluição isocrática e por gradiente em degrau nos picos cromatográficos. As letras A e B correspondem a solução tamponante e um solvente, respectivamente. C1 e C2 são as siglas dos dois componentes.



Naturalmente, as condições de equilíbrio são distintas, a depender da interação dos componentes no sistema. Assim, o tempo de eluição pode se tornar elevado, o que também implica em aumento dos gastos com solventes (BLUMBERG, 2014a; DE LUCA *et al.*, 2020; POOLE; ATAPATTU, 2020). Outro fator que muitas vezes dificulta aplicações analíticas é a baixa resolução (pico disperso – C2 da eluição isocrática - da Figura 2) (JANSON, 2011).

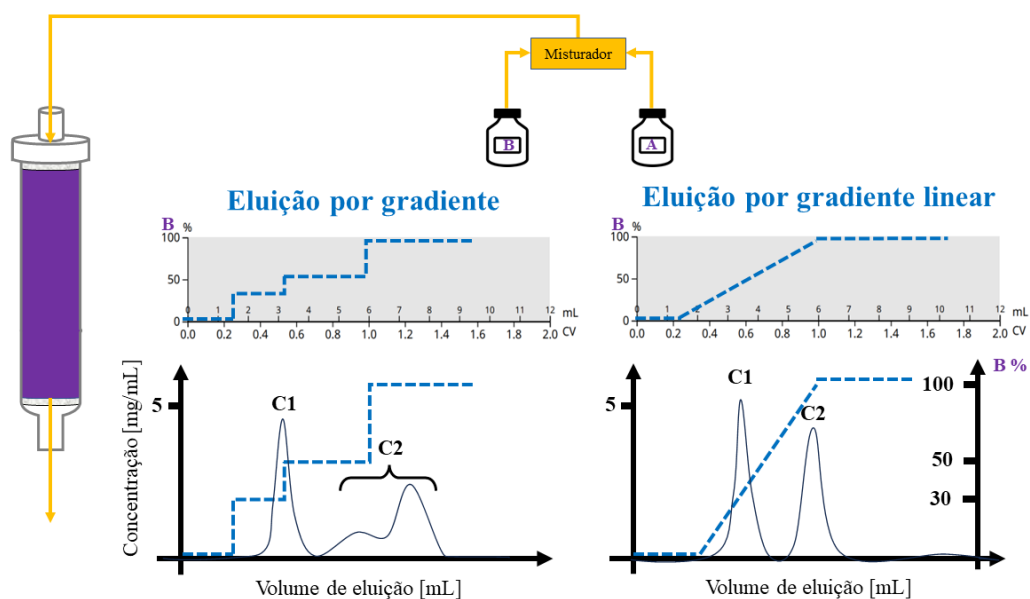
Para melhorar a resolução analítica e reduzir custos, outras formas de eluição são empregadas, num esquema de eluição gradiente, onde há variações na fase móvel durante o processo cromatográfico. A eluição por gradientes, em forma de degrau, é uma aplicação de mais de uma eluições isocráticas. Na Figura 2, a fração do solvente B na fase móvel são presenciadas em 50% [v/v] e 100% [v/v]. Neste exemplo, a eluição por gradiente inicia com nenhuma fração do solvente B, o que atrasa o pico do componente 1 (C1). Adicionar 100% de B na fase móvel, permite que C2 saia da coluna com um menor volume de eluição, além de afunilar o pico (aumentar a resolução). Iniciar a eluição com 50% poderia auxiliar na separação desses compostos, C1 e C2.

De modo similar ao exemplificado para condições analíticas, a cromatografia preparativa também sofre influência das interações dos componentes no sistema. Apesar de muitas vezes não ocorrer nesse caso a separação completa dos picos, a eluição gradiente também pode ser demandada, em busca de favorecer ao mesmo tempo a separação e a produtividade do sistema cromatográfico.

A título de exemplo, várias concentrações de sal podem ser utilizadas para eluição em cromatografia de troca iônica. Assim, em condições preparativas (alta massa do componente chave injetada no sistema), a concentração de sal pode ser maior para favorecer a eluição. A eluição por gradiente é muito comum para separação de misturas de biomoléculas, em que as propriedades entre as moléculas são similares (HARRISON *et al.*, 2015; JANSON, 2011). No entanto, a eluição por gradientes em degrau pode dificultar a separação e o aproveitamento de vários compostos ao mesmo tempo.

Uma forma de contornar é aumentar a quantidade de degrau da eluição em gradiente (*stepwise elution*). Este tipo de eluição tem muitas semelhanças com a eluição por gradiente linear (Figura 3). No entanto, a diferença reside no fato de que a fração de B não aumenta de maneira contínua, mas sim em incrementos discretos. A eluição por gradiente em degrau pode trazer alguns inconvenientes, tais como picos deformados (reduzir a resolução), ilustrado na Figura 3 (JANSON, 2011).

**Figura 3** - Representação hipotética dos efeitos das eluição por gradientes em degrau e linear nos picos cromatográficos. As letras A e B correspondem a solução tamponante e um solvente, respectivamente. C1 e C2 são as siglas dos dois componentes.



No exemplo para eluição por gradientes em degrau, a fração inicial do solvente B é antecipada ao se comparar com a Figura 2, pois 30% de B é alimentada já em ~1,5 mL, enquanto o mesmo ocorre somente em ~2,5 mL na Figura 2. Neste caso, o pico C1 elui na interface de duas concentrações distintas de solvente (mudança abrupta de fração de B, 30% para 50%) possui um formato típico, com uma frente acentuada e uma extremidade de cauda. O pico C2 também é antecipado devido à soma de todo eluente que já passou pela coluna, gerando uma capacidade de resolução não adequada. Pelo fato de C2 começar a eluir antes, existe uma falsa separação de um componente em dois picos (JANSON, 2011). Uma maneira de contornar esse problema seria incrementar o número de degrau até que a variação na concentração do agente eluidor entre cada degrau se torne mínima. Portanto, a cromatografia com eluição por gradiente linear ganha destaque.

Outrora, a chamada “força eluotrópica” da fase móvel é ampliada continuamente na eluição por gradiente linear, favorecendo a diferenciação das interações dos componentes na coluna e mantendo a separação, além de melhorar a resolução cromatográfica (BLUMBERG, 2014a; JANSON, 2011). Como ilustrado na Figura 3, os efeitos de cauda são reduzidos na ausência de descontinuidades do aumento de fração de B (C1 da eluição por gradiente), e os falsos picos não são observados (C2 da eluição por gradiente linear comparada com a retangular).

A eluição por gradiente linear é amplamente aplicada no desenvolvimento de métodos cromatográficos (GRITTI, 2021). Sendo fundamental para operações cromatográficas preparativas em aplicações de bioprodutos, atingindo os setores farmacêutico, de produtos naturais e alimentício (GRITTI, 2021). Desta forma, o aumento progressivo da força eluotrópica da fase móvel modifica as condições físico-químicas do meio, de modo que o equilíbrio seja deslocado em favor das espécies não ligadas. Logo, as definições quanto ao modo de eluição e gradiente aplicado são fundamentais para o desenvolvimento de processos cromatográficos (GUIOCHON *et al.*, 2006; HARRISON *et al.*, 2015; SNYDER; DOLAN, 2007).

### **2.3.2. Seleção da fase estacionária**

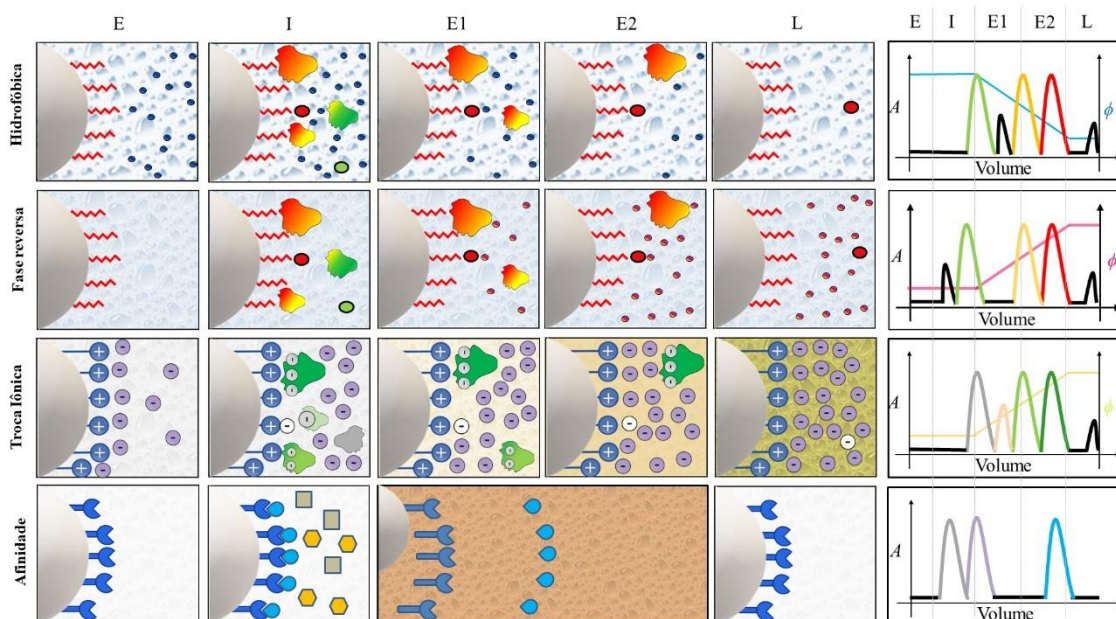
A fase estacionária sólida costuma ser um adsorvente orgânico (resina de polimerização), inorgânico (como a sílica) ou compósito (HARRISON *et al.*, 2015; MOLLERUP *et al.*, 2007). O material sólido pode realizar a cromatografia por diferentes interações com os componentes químicos da fase móvel. Nos casos mais comuns da cromatografia líquida estão a cromatografia hidrofóbica, de fase reversa e fase normal, de troca iônica e a cromatografia por afinidade (AMERSHAM BIOSCIENCES, 2004; HARRISON *et al.*, 2015; HOUDE; BERKOWITZ, 2019). As diferentes interações entre moléculas e fase estacionária são retratadas esquematicamente na Figura 4. Existem formas de exemplificar a interação da fase estacionária com a móvel. Aqui é demonstrado em 4 etapas:

- Equilíbrio (E), etapa de preparo da coluna para alcançar as condições ideais de adsorção;
- Carregamento ou injeção da amostra (I), que geralmente ocorre após o equilíbrio e a injeção de fase móvel;
- Eluição (E1 e E2), etapas em que se muda a concentração de agente eluidor da fase móvel, utilizados em caso de eluição por gradiente;
- Limpeza (L), que consiste em retirar quaisquer contaminantes que possam permanecer na coluna e que pode ser realizada antes do equilíbrio ou para armazenar a coluna;

Pressupondo a detecção UV-VIS, o valor da absorbância (A) está representado esquematicamente na última coluna da Figura 4. Comumente, em esquemas de eluição

cromatográfica, uma etapa de lavagem é adicionada antes da eluição. Com o objetivo de remover os componentes considerados contaminantes ou que não apresentam retenção, essa etapa está sendo retratada como a etapa E1.

**Figura 4** - Diferentes interações dos componentes químicos e a fase estacionária. Equilíbrio (E), Injeção da amostra (I), Eluição 1 (E1), Eluição 2 (E2) e Limpeza da coluna (L) são as etapas cromatográficas. Formas geométricas irregulares coloridas correspondem as moléculas. A intensidade das cores está relacionada com a capacidade de interação das moléculas com a fase estacionária, mais clara menor capacidade e mais escuras com maior capacidade. Círculos com contorno vermelhos ou verdes são moléculas ou misturas indesejadas no processo.



Adaptado (AMERSHAM BIOSCIENCES, 2004; GE HEALTHCARE, 2006; GE HEALTHCARE, 2010)

### 2.3.2.1. cromatografia hidrofóbica

Na cromatografia hidrofóbica, a separação dos componentes ocorre através das diferenças na hidrofobicidade. Comumente, para separação de biomoléculas, o sal é utilizado como agente que fortalece a capacidade de interação da molécula com a matriz hidrofóbica (HARRISON *et al.*, 2015; STABY; RATHORE; AHUJA, 2017). Neste contexto, as proteínas interagem com a superfície hidrofóbica devido a presença de sais na fase fluida, ou seja, a interação ocorre pela redução de solubilidade do soluto na fase móvel. A cromatografia hidrofóbica é sensível ao pH, ao sal usado, ao tipo de tampão e à temperatura (AMERSHAM BIOSCIENCES, 2001; GE HEALTHCARE, 2006; HARRISON *et al.*, 2015; STABY; RATHORE; AHUJA, 2017).

Na primeira linha da Figura 4, cores mais próximas do verde são as menos hidrofóbicas e as vermelhas mais hidrofóbicas, as amarelas são consideradas

moderadamente hidrofóbicas. O sal está representado por círculos azuis, o que na última coluna está indicado pela concentração do sal ( $\phi$ ). A etapa de equilíbrio (E) adequa a coluna para otimizar a adsorção e quando ocorre a injeção as moléculas que ficam retidas na fase estacionária são eluídas nas etapas E1 e E2. Quanto menor a quantidade de sal na etapa de eluição (E1 e E2), menor é a força de interação com a fase estacionária, portanto, os componentes mais hidrofóbicos tendem a ficar mais tempos retidos. A eluição das moléculas pode ser acompanhada pelos picos da última coluna, as cores dos picos estão associadas com a cor das moléculas, e as moléculas indesejadas (contaminantes) com cor preta.

A cromatografia hidrofóbica pode ser utilizada em diferentes etapas de um protocolo de purificação, seja para captura inicial, purificação intermediária ou polimento final de um componente. Amplamente empregada na purificação de proteínas, essa técnica permite obter frações altamente puras e concentradas, o que é especialmente vantajoso para aplicações na indústria biotecnológica. Um benefício adicional é a preservação da atividade biológica das proteínas, pois a purificação ocorre com base em sua hidrofobicidade natural, dispensando modificações químicas nas amostras e mantendo intactas a estrutura e a função das proteínas (AMERSHAM BIOSCIENCES, 2001; GE HEALTHCARE, 2006). Dessa forma, esse tipo de interação é indicado nas etapas intermediárias do processo, devido a sua boa capacidade de separação e seletividade, alta velocidade de processamento e razoável eficácia no polimento do componente alvo. Caso seja necessário um polimento adicional, a cromatografia de fase reversa pode ser empregada como etapa complementar (AMERSHAM BIOSCIENCES, 2001).

### **2.3.2.2. cromatografia de fase reversa e normal**

No contexto exposto, a água é frequentemente descrita como o meio de maior força eluotrópica para cromatografia de adsorção hidrofóbica. Porém, exatamente o oposto se aplica em sistemas de fase reversa, que na maioria dos casos utilizam solventes orgânicos para ampliar a força eluotrópica da fase móvel (CASS; CASSIANO, 2015; MEYER, 2010; SNYDER; DOLAN, 2007). A cromatografia é geralmente classificada como de fase reversa ou normal, dependendo das características de eluição (HARRISON *et al.*, 2015; MEYER, 2010).

Na fase reversa, a fase estacionária é hidrofóbica (ou seja, apolar), o que significa que ela tem uma afinidade maior por solutos apolares. Com uma maior concentração de

água na fase móvel, a eluição dos solutos é reduzida, dificultando a dessorção. Para promover a dessorção dos solutos e aumentar a eluição, é necessário incluir compostos apolares, como solventes orgânicos (por exemplo, hidrocarbonetos) na fase móvel. Esses solventes diminuem as interações dos solutos com a fase estacionária, facilitando sua liberação e movimentação ao longo da coluna (HARRISON *et al.*, 2015; MEYER, 2010).

Os solutos mais apolares são facilmente retidos pela fase estacionária na cromatografia de fase reversa (segunda linha da Figura 4), em que o material sólido possui características superficiais hidrofóbicas, como o exemplo clássico das sílicas ativadas com cadeias carbônicas, alquil sílica (AMERSHAM BIOSCIENCES, 2001; MEYER, 2010). Como característica da técnica, a fase reversa possui uma boa seletividade e boa eficácia no polimento do componente alvo. A principal condição está na necessidade de utilizar solventes orgânicos apolares, o que pode causar riscos na atividade biológica quando trabalhar com biomoléculas (AMERSHAM BIOSCIENCES, 2001).

A cromatografia de fase reversa se difere da hidrofóbica, pois a denominação de fase reversa costuma se referir à operação em que um solvente apolar é utilizado em água como fase móvel. Já na cromatografia hidrofóbica, além do solvente apolar, um sal é aplicado para favorecer a retenção da molécula na coluna (HARRISON *et al.*, 2015; STABY; RATHORE; AHUJA, 2017).

Já na cromatografia de fase normal (hidrofílica), a interação dos solutos na fase móvel com a estacionária é promovida em menores concentrações de água (HARRISON *et al.*, 2015; MEYER, 2010). Geralmente, a sílica empregada é composta por sílica ( $SiO_2$ ) ou sintetizada com outros materiais apolares, como alumina (CASS; CASSIANO, 2015).

Ambos, fase normal ou reversa são representadas na segunda linha da Figura 4, o que difere é o material e os solventes da eluição utilizados. O aumento da concentração do solvente (gradiente de eluição), auxilia a remoção do componente mais retido na coluna cromatográfica, o que pode ser acompanhado pelos picos da última coluna. As características dessa técnica são semelhantes à de fase reversa, mas empregado para purificar moléculas polares (HARRISON *et al.*, 2015; MEYER, 2010).

### **2.3.2.3. cromatografia de troca iônica**

Na cromatografia de troca iônica (terceira linha da Figura 4), a separação é baseada na interação entre um composto eletricamente carregado (cargas desbalanceadas,

molécula de carga negativa da Figura 4) e um meio cromatográfico com carga oposta (carga positiva da Figura 4). A resolução da separação é considerada muito alta com elevada capacidade de carregamento de amostras (AMERSHAM BIOSCIENCES, 2001; HARRISON *et al.*, 2015; JANSON, 2011).

Essa técnica utiliza resinas contendo grupos funcionais carregados positivamente (para troca aniônica) ou negativamente (para troca catiônica). Inicialmente, a coluna é equilibrada (E) com uma solução de baixa força iônica, permitindo que as moléculas carregadas se liguem ao suporte. Durante o processo de separação, as moléculas de interesse interagem com os grupos funcionais da matriz. A eluição (E1 e E2) ocorre ao aumentar a força iônica ou alterar o pH da solução, competindo com as moléculas ligadas e deslocando-as da coluna de forma gradativa. Por fim, ocorre uma lavagem (L) para remover resíduos não ligados e preparar a coluna para um novo ciclo.

A cromatografia de troca iônica apresenta alta resolução, alta capacidade e alta velocidade. Ela é adequada para diferentes fases do processo de purificação, sendo utilizada na captura, no refinamento intermediário e no polimento final das amostras. Em condições iniciais, a técnica exige baixa força iônica, mas, para a eluição, é necessário aplicar alta força iônica ou realizar alterações no pH (AMERSHAM BIOSCIENCES, 2001). Essa versatilidade torna a cromatografia de troca iônica amplamente utilizada na separação de proteínas (BENEDINI *et al.*, 2020; BUYEL; FISCHER, 2014), ácidos nucleicos (AMERSHAM BIOSCIENCES, 2004) e outras biomoléculas carregadas (DE LUCA *et al.*, 2020; HUUK *et al.*, 2016), garantindo alta eficiência e concentração das amostras purificadas (AMERSHAM BIOSCIENCES, 2004).

### **2.3.2.1. cromatografia por afinidade**

A cromatografia por afinidade (última linha Figura 4) oferece alta seletividade por utilizar uma interação altamente específica entre moléculas. Assim, se separam biomoléculas com base em uma interação reversível com um grupo funcional ou um ligante específico na superfície sólida (AMERSHAM BIOSCIENCES, 2001; GE HEALTHCARE, 2010; JANSON, 2011). A reversibilidade leva à recuperação da molécula (terceiro quadrante - última linha da Figura 4) e é obtida com a mudança do meio, como por exemplo, a polaridade, pH, força iônica ou inclusão de um competidor (GE HEALTHCARE, 2010).

O processo cromatográfico envolve a interação seletiva entre a molécula-alvo e o ligante, enquanto os componentes não específicos da amostra são eluídos. Após a etapa de ligação (I), a eluição (E1 e E2) ocorre sob condições que rompem essa interação específica, como alterações no pH, força iônica, ou pela adição de competidores que deslocam a molécula-alvo. Essa técnica oferece alta resolução, alta capacidade e alta velocidade, sendo eficaz tanto na fase de captura quanto no polimento final das amostras. As condições de amostra são específicas para permitir a ligação inicial, sendo ideal para purificação de proteínas recombinantes, anticorpos monoclonais e outras biomoléculas com interações específicas (AMERSHAM BIOSCIENCES, 2001).

De modo geral, a interação de uma proteína com uma fase estacionária pode ser alterada ao ajustar diversos fatores. Isso pode incluir a substituição da matriz sólida (por exemplo, de sílica para agarose), a modificação do tamanho dos poros, ou até mesmo a troca do tipo de interação, como a mudança do método cromatográfico (BERNAU *et al.*, 2022; BUYEL; FISCHER, 2014). Portanto, entender as propriedades físico-químicas que governam a separação é um dos principais desafios no desenvolvimento de processos cromatográficos. (BESENHARD *et al.*, 2021).

#### **2.4. Desenvolvimento de métodos cromatográficos**

O desenvolvimento de métodos cromatográficos é frequentemente dificultado devido à alta complexidade das amostras. Moléculas que possuem comportamentos cromatográficos semelhantes são consideradas obstáculos para separações eficientes (DEBRUS *et al.*, 2011). Por consequência, o tempo gasto no desenvolvimento de processos, desde a pesquisa até a comercialização do bioproduto pode levar mais de uma década, como é o caso, por exemplo, das proteínas terapêuticas. Esses dados variam significativamente dependendo da empresa (capital de investimento) e do bioproduto a ser produzido, mas o custo de desenvolvimento facilmente excede um ou mais bilhões de dólares (HARRISON *et al.*, 2015; HOUDE; BERKOWITZ, 2019).

Em virtude disso, técnicas de “Desenvolvimento de Processos de Alto Desempenho” (*High Throughput Process Development*, HTPD), estão sendo cada vez mais utilizadas no desenvolvimento de processos de separação, de modo a reduzir o consumo de insumos (BARKER *et al.*, 2015; ŁACKI, 2014; ŁACKI, 2012; LIETTA *et al.*, 2022; SILVA; EPPINK; OTTENS, 2021). De modo geral, técnicas de HTPD

envolvem redução de escala para experimentação, automação e redução de tempo e custo de análise.

As ferramentas HTPD combinam métodos analíticos, planejamento experimental e análises de dados, a fim de cobrir todas etapas de desenvolvimento de um produto biotecnológico, tais como, cultivo, purificação e formulação (HUBBUCH, 2012; ŁACKI, 2014). As novas atualizações da terminologia HTPD incluem a utilização de metodologias *High Throughput Screening* (HTS) e automação na fase experimental, a modelagem matemática e a simulação desses processos (BARKER *et al.*, 2015; ŁACKI, 2014; ROQUE *et al.*, 2020).

O HTS pode incluir ensaios em coluna ou em poços (batelada), que são importantes para triagem de material de separação e de condições de separação de novos fármacos e demais compostos bioativos (KIESEWETTER *et al.*, 2016). Entre as técnicas HTS mais empregadas estão as de miniaturização (BARKER *et al.*, 2015; GE HEALTHCARE, 2009; ROQUE *et al.*, 2020; SILVA; EPPINK; OTTENS, 2021).

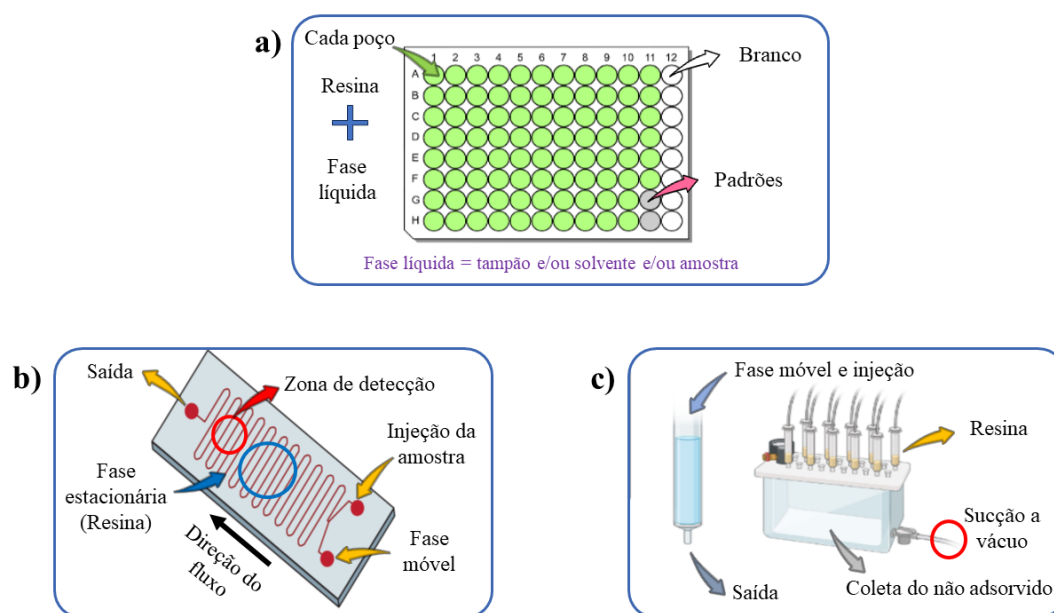
#### **2.4.1. Miniaturização e HTPD no desenvolvimento de métodos cromatográficos**

No desenvolvimento de processos cromatográficos, a miniaturização pode ser empregada na triagem de resinas e solventes (BARKER *et al.*, 2015; ROQUE *et al.*, 2020; SILVA; EPPINK; OTTENS, 2021). O desenvolvimento de processos em microescala visa a reduzir o custo com reagentes e acelerar o desenvolvimento de processos para fabricação de novos bioterapêuticos (ANDAR *et al.*, 2019). Uma das primeiras evidências da aplicação das ferramentas HTS está na utilização de placas de microtitulação de 96 poços em processos biotecnológicos (BARKER *et al.*, 2015; SILVA; EPPINK; OTTENS, 2021).

Outros exemplos de aplicação da miniaturização em processos cromatográficos estão no uso de pontas de micropipetas de titulação, tubos de extração em fase sólida (SPE) e ferramentas microfluídicas, conhecidos também como microchips (SILVA; EPPINK; OTTENS, 2021). Geralmente, essas abordagens experimentais replicam condições tradicionais de escalas maiores e tempo de contato entre a molécula e a resina, mas com os volumes da fase móvel e estacionária (sólida) reduzidos (ŁACKI, 2014).

A Figura 5 ilustra os três principais formatos experimentais em miniaturização, sendo eles microplacas (Figura 5a), microchips (Figura 5b) e micropipetas ou SPE (Figura 5c). As microplacas (Figura 5a) foram inseridas na cromatografia líquida inicialmente para etapa de preparação de amostra, procedimentos de coleta, entre todas as etapas que antecedem a fase analítica (KRCMOVA; SOLICHOVA; SOLICH, 2013). Na purificação de bioprodutos, os experimentos em microplacas são realizados de modo a aproximá-los dos ensaios em bancada. As placas mais utilizadas são as de 96 poços (como no caso da Figura 5a) e 384 poços, no qual a numeração de poços representa a quantidade de experimentos (condições experimentais) permitidas para cada placa (BARKER *et al.*, 2015; ŁĄCKI, 2014; ROQUE *et al.*, 2020; SILVA; EPPINK; OTTENS, 2021).

**Figura 5** - Exemplos dos principais tipos de miniaturização. a) microplacas, b) microchips e c) minicolunas ou ponteiras de micropipetas de titulação.



Na Figura 5a, a cada poço contém uma resina (representada em verde) e uma fase líquida que pode ser tampão, solvente ou amostra. Alguns poços estão marcados como "Branco" (controle negativo) e outros contêm padrões (indicado pela seta rosa), que podem ser usados para calibração ou referência. Esse formato é comum em ensaios de adsorção.

A preparação dos ensaios de triagem das microplacas conta com a adição de resina no interior dos poços e em seguida a solução com solvente e amostra a se analisar.

Semelhante aos ensaios em bateladas convencionais, as placas normalmente contam com sistemas de filtração a vácuo (BARKER *et al.*, 2015; ŁAÇKI, 2014; SILVA; EPPINK; OTTENS, 2021). O que se assemelha com o sistema a vácuo da Figura 5c, em que o a amostra não adsorvida é coletada e transferida para uma placa de leitura (por exemplo, UV-Vis).

A baixa utilização do espaço físico laboratorial e o pequeno gasto com reagentes favorecem a aceitação das microplacas (SILVA; EPPINK; OTTENS, 2021). No entanto, o usuário pode encontrar dificuldades em representação de uma coluna cromatográfica, principalmente, no aumento concentrações de carga de proteína, tipos de lavagem ou condições de eluição (BARKER *et al.*, 2015).

Triagens utilizando as microplacas são capazes de ser automatizadas por meio de manipuladores de líquidos (*liquid handling system* - LHS) (BARKER *et al.*, 2015; ŁAÇKI, 2014; SILVA; EPPINK; OTTENS, 2021). Existem diversos tipos de LHS, no geral, esses manipuladores de líquidos automatizados podem ser utilizados em procedimentos de diluição em série, transferência e injeção de amostras, e muitos deles são próprios para trabalhar com essas microplacas (SILVA; EPPINK; OTTENS, 2021) Neste caso, os experimentos em bateladas são divididos em diversas etapas discretas com diferentes condições de carga de proteína, lavagem, regeneração e eluição. A adição desse sistema permite uma melhor similaridade dos fenômenos que ocorrem na coluna em relação aos processos manuais (BARKER *et al.*, 2015).

Na Figura 5b, a fase estacionária (resina) é fixa dentro de um canal, e a fase móvel (solvente ou amostra) flui através dela, o desenho é ilustrativo, não representa corretamente ao utilizado pela literatura (CHAN *et al.*, 2014). A amostra é injetada e segue o fluxo indicado pela seta preta. Na zona de detecção (ponto vermelho), diferentes compostos podem ser identificados conforme interação com a resina e se separam no tempo.

Nos anos recentes, atenção também tem sido dada à experimentação utilizando dispositivos baseados em microfluídica (ŁAÇKI, 2014; ROQUE *et al.*, 2020; SILVA; EPPINK; OTTENS, 2021). Comparado com os sistemas automatizados de manuseamento de líquidos em microplacas (LHS), os microchips (Figura 5b) podem fornecer resultados mais próximos de uma coluna cromatográfica, em escalas muito pequenas, na faixa de micrômetros até na faixa de nanolitros (SILVA; EPPINK; OTTENS, 2021).

A fase móvel e a injeção da amostra nos microchips (Figura 5b) geralmente são bombeadas por bombas tipo seringa (CHAN *et al.*, 2014). O material adsorvente (fase estacionária) é acondicionado na região central da placa. A tecnologia dos dispositivos microfluídicos ainda necessita de maior aceitação pela comunidade (SILVA; EPPINK; OTTENS, 2021). A dificuldade de trabalhar com volume em escalas nanoscópica e os valores desses microchips são considerados as principais barreiras (ROQUE *et al.*, 2020; SILVA; EPPINK; OTTENS, 2021). Acreditam-se que a utilização de impressoras 3D possa contribuir para redução dos custos desses dispositivos (SILVA; EPPINK; OTTENS, 2021).

Como nas placas de microtitulação, as colunas SPE (Figura 5c) também são comumente utilizadas para preparo de amostra (KRCMOVA; SOLICHOVA; SOLICH, 2013). Ao desenvolver métodos cromatográficos que utilizam mini colunas ou ponteiras empacotadas, as condições hidrodinâmicas podem se assemelhar às observadas em um leito empacotado. Neste cenário, a máxima eficiência é obtida ao utilizar todos os canais disponíveis em paralelo, por meio de processos automatizados. Assim, a fase móvel quanto a amostra é impulsionada (utilizando pulsos discretos) através da fase estacionária (ŁACKI, 2012).

Praticamente todas as abordagens experimentais de *screening* da plataforma HTPD têm potencial de aplicação consistente, levando em conta suas limitações (ŁACKI, 2014; ŁACKI, 2012). Métodos de *screening* geram uma grande quantidade de dados experimentais que precisam ser tratados. Sendo assim, cada vez mais se faz necessário o emprego de modelos matemáticos para auxiliar na etapa de triagem. Sejam eles empíricos, fenomenológicos ou híbridos, todos visam a favorecer a seleção de melhores condições cromatográficas para purificação de produtos biotecnológicos (BESENHARD *et al.*, 2021).

Os modelos matemáticos podem ser utilizados para prever a interação entre a molécula alvo e o material empregado para separação. Várias técnicas são utilizadas para prever a retenção desses compostos, ou simular a eluição dos componentes em um leito fixo (BESENHARD *et al.*, 2021; GRITTI, 2021; HADDAD; TARAJI; SZÜCS, 2021). Deste modo, as atividades desenvolvidas utilizando pipetas de múltiplos canais, microplacas de 96 poços e minicolunas, aliadas aos modelos fenomenológicos abordados nesta tese, se colocam em um plano geral e em contexto bastante inovador. Nesse

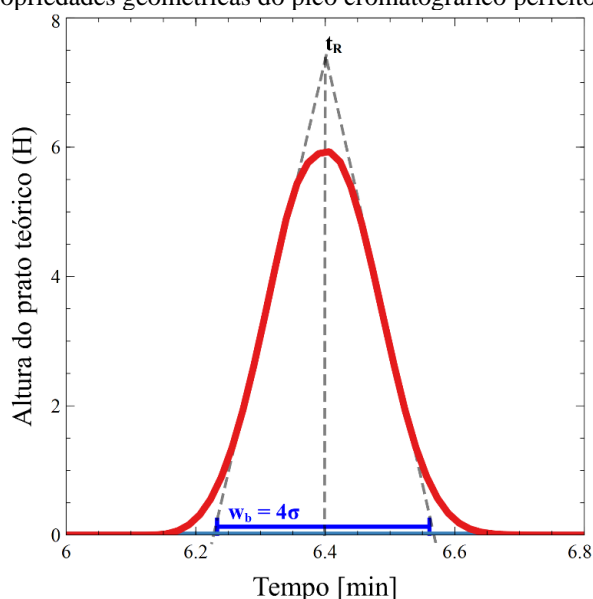
contexto, a próxima seção apresenta uma breve revisão da previsão do tempo de retenção e seus modelos para o desenvolvimento de métodos cromatográficos.

## 2.5. Previsão do tempo de retenção em cromatografia líquida

A previsão do tempo de retenção é uma ferramenta essencial no desenvolvimento de métodos cromatográficos, pois permite reduzir a quantidade de experimentos necessários e otimizar as condições de separação (GRITTI, 2021). A retenção de um soluto em uma coluna cromatográfica depende de diversos fatores, como a interação com a fase estacionária, a composição da fase móvel e as condições operacionais do sistema. Nesse aspecto, é importante destacar que as isotermas de adsorção possuem papel vital na descrição dos fatores de separação e da capacidade de saturação da coluna (FORSSÉN; ARNELL; FORNSTEDT, 2006).

A medição do tempo ou volume com que a molécula alvo fica retida na coluna é o procedimento experimental mais utilizado para estimar as propriedades físico-químicas de adsorção (POOLE; ATAPATTU, 2020; RAJENDRAN *et al.*, 2020). Assim, quando citado no texto, o tempo ou volume de retenção estará remetendo ao centro de um pico do cromatograma (Figura 6) (HARRISON *et al.*, 2015). A altura Equivalente a um Prato Teórico ( $H$ ), o tempo de retenção de uma molécula na coluna ( $t_R$ ), a largura do pico na base ( $w_b$ ) e o desvio padrão ( $\sigma$ ) são as variáveis mais utilizadas para análise das propriedades geométrica dos picos cromatográficos.

**Figura 6** – Propriedades geométricas do pico cromatográfico perfeito (Gaussiano).



Adaptado (HARRISON *et al.*, 2015)

Os métodos de eluição por gradiente (discutido ao final do tópico 2.3) são um dos mais desafiadores para ajuste de parâmetros, dentre as diversas dificuldades encontradas na predição dos tempos de retenção (ÅSBERG *et al.*, 2013; GRITTI, 2021; GUIOCHON *et al.*, 2006). Visto que as previsões de retenção na eluição por gradiente são muito sensíveis à concentração do modificador, o que pode dificultar a determinação das isotermas de adsorção (ÅSBERG *et al.*, 2013).

Diversos modelos matemáticos têm sido desenvolvidos para descrever e prever o comportamento de retenção dos solutos em cromatografia líquida. Esses modelos podem ser classificados de acordo com os princípios físicos e químicos que regem as interações entre o soluto, a fase móvel e a fase estacionária.

- Modelo de Força do Solvente Linear (*Linear Solvent Strength* - LSS): Baseado na relação entre a concentração do modificador na fase móvel e o coeficiente de retenção do soluto. É amplamente utilizado em cromatografia de fase reversa devido a sua simplicidade e aplicabilidade em gradientes lineares (ÅSBERG *et al.*, 2013; BESENHARD *et al.*, 2021; DE LUCA *et al.*, 2020; GRITTI, 2021; GUIOCHON *et al.*, 2006; HADDAD; TARAJI; SZÜCS, 2021; KACZMARSKI; CHUTKOWSKI, 2020; SNYDER; DOLAN, 2007; STABY; RATHORE; AHUJA, 2017).
- Modelo de Interação Eletrostática e Hidrofóbica (*Mobile Phase Modulator* - MPM): Considera a contribuição de interações eletrostáticas e hidrofóbicas na retenção dos solutos, sendo útil para separações que envolvem biomoléculas ou compostos polares.
- Modelo de Equilíbrio de Associação: Baseado no conceito de formação de complexos entre o soluto e os componentes da fase móvel, empregado para representar a competição entre proteínas e soluções iônicas na cromatografia de troca iônica.
- Modelos Matemáticos para Previsão da Retenção: Engloba abordagens mais empíricas, que incorporam equações matemáticas, tal como planejamento fatorial ou descritores moleculares, para descrever o transporte de massa e os efeitos difusivos dentro da coluna cromatográfica.

Nesta seção, serão apresentados os principais modelos utilizados para a predição do tempo de retenção, destacando suas hipóteses e aplicações. Cada um desses modelos será detalhado nas subseções a seguir, destacando suas vantagens, limitações e aplicações práticas na otimização de processos cromatográficos.

### 2.5.1. Modelo de força do solvente linear (LSS)

Os parâmetros do modelo LSS devem ser calibrados aferindo a retenção de um soluto em duas composições de eluente, tipicamente de eluentes aquosos-orgânicos binários que são empregados na cromatografia de fase reversa (WANG, Aosheng; CARR, 2002). No desenvolvimento de métodos cromatográficos auxiliados por modelos matemáticos, este modelo é considerado um dos mais simples para aplicação na cromatografia líquida de eluição por gradiente (BESENHARD *et al.*, 2021; GRITTI; GUIOCHON, 2008).

Neste modelo, o aumento da concentração do modificador na fase móvel provoca uma redução do fator de retenção ( $k$ ) baseado em uma equação empírica linear, Equação 1, em que a concentração do modificador é representada pela letra  $\phi$  (DE LUCA *et al.*, 2020; KACZMARSKI; CHUTKOWSKI, 2020; SNYDER; DOLAN, 2007).

$$\ln k(\phi) = \ln k_0 - S\phi \quad (1)$$

O fator de retenção ( $k$ ) é medido por meios de experimentos em colunas, em que a diferença dos tempos de retenção de um componente ( $t_R$ ) e um traçador ( $t_T$ ) determina o valor desse parâmetro. O tempo de retenção do traçador é a eluição de um componente que não possui interação com a superfície do sólido. Ambos, traçador e componente, são medidos pelo centro do pico. A constante  $k_0$  é definida como o fator de retenção para um componente quando  $\phi = 0$  (solvente fraco ou, geralmente, água) e  $S$  a interação do componente com as fases móvel e estacionária. O  $S$  neste modelo remete à inclinação de um gráfico logaritmo do fator de retenção versus a concentração do modificador (SNYDER; DOLAN, 2007).

Como já citado na seção 2.3.1.1, o uso do modificador na fase móvel em um gradiente de concentração tende a causar eluição das espécies retidas por meio da mudança de equilíbrio entre as fases. A Equação 2 representa a concentração do solvente (modificador) em função do tempo,  $\phi(t)$ , na entrada da coluna durante a alteração do

modificador no gradiente linear (DE LUCA *et al.*, 2020; HARRISON *et al.*, 2015; KACZMARSKI; CHUTKOWSKI, 2020).

$$\phi(t) = \phi_0 + \frac{\Delta\phi}{\Delta t_g}(t - t_{G,inj}), \quad (2)$$

em que,  $\phi_0$  é a concentração inicial do solvente (modificador de fase),  $\Delta\phi$  a diferença da concentração inicial e final do solvente,  $\Delta t_g$  o tempo total de injeção de um solvente e  $t_{g,inj}$  o tempo inicial que ocorre a injeção do solvente modificador de fase.

Apesar do fator de retenção não ser um parâmetro termodinâmico, o modelo LSS geralmente é utilizado para prever isotermas de equilíbrio ( $q$ ), como exemplo a isoterma de Langmuir, Equação 3 (DE LUCA *et al.*, 2020; GUIOCHON *et al.*, 2006; KACZMARSKI; CHUTKOWSKI, 2020).

$$q = \frac{bq_s C_L}{1 + bC_L} \quad (3)$$

Na Equação 3,  $q_s$  é a constante de saturação da partícula,  $b$  a constante de equilíbrio e  $C_L$  corresponde à concentração do líquido (fase móvel).

A associação dos fatores de retenção do modelo LSS com efeitos termodinâmicos, como exemplo, a constante de equilíbrio ( $b$ , Equação 4) pode ser melhor compreendida no Apêndice “A.1. Análise do fator de retenção para eluição isocrática” (DE LUCA *et al.*, 2020; GUIOCHON *et al.*, 2006; HARRISON *et al.*, 2015; SNYDER; DOLAN, 2007). Neste caso, por meio da relação do fator de retenção ( $k$ ) com a razão de fase ( $F = (1 - \varepsilon_T)/\varepsilon_T$ ) e a constante de Henry ( $a = bq_s$ ) é possível acoplar o modelo LSS a modelos fenomenológicos (BESENHARD *et al.*, 2021; DE LUCA *et al.*, 2020; GUIOCHON *et al.*, 2006; KACZMARSKI; CHUTKOWSKI, 2020)

$$k = k_0 \exp^{-S_i\phi} \equiv Fbq_s = Fq_s b_0 \exp^{-S_i\phi}, \quad (4)$$

em que  $b_0$  é a constante de equilíbrio a concentrações baixas ou nulas de modulador e  $S$  passa a ser referido no texto como a constante do modulador.

Uma solução de um sal pode ser empregada como agente modificador, constante do modulador (GRITTI, 2021; STABY; RATHORE; AHUJA, 2017), principalmente para cromatografia de força iônica (KUMAR *et al.*, 2015) e a hidrofóbica (WANG, Gang; HAHN; HUBBUCH, 2016). Neste caso, as contribuições da troca iônica e interações hidrofóbicas, levam a uma relação de aumento da tensão superficial decorrente a interação

hidrofóbica e à solubilidade da molécula (ARAKAWA *et al.*, 2023; SHEKHAWAT *et al.*, 2023).

A própria técnica de eluição por gradiente já torna os mecanismos de separação mais complexos e dificulta a implementação de modelos que descrevam a retenção. Portanto, esse problema ainda é considerado como um grande desafio para desenvolvimento de novos métodos e otimizações desses processos (BESENHARD *et al.*, 2021; GUIOCHON *et al.*, 2006).

### 2.5.2. Modelo de interação eletrostática e hidrofóbica (MPM)

Denominado por Karlsson e colaboradores como Modelo de Modificador de Fase Móvel (*Mobile Phase Modulator*, MPM), este modelo empírico foi proposto por Melander, Rassi e Horváth e descreve a influência da adição de sal à fase móvel na retenção de proteínas (GU, 2015; KARLSSON *et al.*, 2004; KUMAR *et al.*, 2015; MELANDER; EL RASSI; HORVÁTH, 1989). Apesar das simplificações, este modelo baseia-se em teorias físico-químicas que consideram não apenas a força do solvente, abordada no LSS, mas também como a presença de sais altera as interações entre as proteínas e a fase estacionária. Portanto, se acoplar o efeito do sal no equilíbrio (modelo LSS), similarmente obtém-se o mesmo resultado do MPM.

A Equação 5 propõe descrever todas as interações hidrofóbicas e eletrostáticas em apenas três parâmetros (GU, 2015; MELANDER; EL RASSI; HORVÁTH, 1989). Esta interação foi proposta para um ambiente contendo proteína, sal e a agarose (fase estacionária), no qual avaliaram os efeitos do sal na retenção de proteínas (MELANDER; EL RASSI; HORVÁTH, 1989).

$$\ln k = \alpha' - \beta \ln \phi + \gamma \phi, \quad (5)$$

Na Equação 5,  $k$  e  $\phi$  são o fator de retenção e a concentração do sal, e os parâmetros  $\beta$ ,  $\gamma$  e  $\alpha'$  são responsáveis pelos efeitos eletrostáticos, hidrofóbicos e os outros efeitos característicos do sistema, respectivamente (GU, 2015; KARLSSON *et al.*, 2004; MELANDER; EL RASSI; HORVÁTH, 1989). Ao aplicar a função exponencial na Equação 5 (representado na Equação 6), e substituir o fator de retenção pela constante de equilíbrio, razão de fase e constante de saturação ( $Fbq_s$ , Equação 4) obtém-se a Equação 7, que pode ser melhor compreendida nos Apêndices “A.1. Análise do fator de retenção para eluição isocrática”.

$$e^{\ln k} = e^{\alpha' - \beta \ln \phi + \gamma \phi}, \quad (6)$$

Utilizam-se as propriedades dos expoentes para separar os termos  $e^{\alpha'}$ ,  $e^{-\beta \ln \phi}$  e  $e^{\gamma \phi}$ . Além disso, aplicando a identidade  $e^{\ln x} = x$ , resulta em  $e^{-\beta \ln \phi} = \phi^{-\beta}$ .

$$Fq_s b = Fq_s (e^{\alpha'} \phi^{-\beta} e^{\gamma \phi}), \quad (7)$$

Assim, todos os efeitos de retenção (hidrofóbico e eletrostáticos) podem ser compensados na constante de equilíbrio (Equação 8). O termo  $e^{\alpha'}$  da Equação 7 pode ser definido como  $b_0$ :

$$b = b_0 \phi^{-\beta} e^{\gamma \phi}, \quad (8)$$

Tanto na cromatografia de troca iônica quanto na hidrofóbica, a concentração de sal afeta a retenção da proteína, ou seja, nos efeitos de adsorção e dessorção (KARLSSON *et al.*, 2004). Assim, é possível visualizar a forma funcional da equação 8 como resultado dado por parâmetros cinéticos, ao escrever o processo de modo análogo à reação com sal como segundo componente (Equação 9), representada por:



em que,  $i$  e  $iL$  são a molécula alvo na fase líquida e sólida (com ligante), respectivamente,  $s_{\beta}L$  é o ligante com  $\beta$  sais adsorvidos e  $s$  representa o sal. Nesta reação (Equação 9), o sal é geralmente considerado como inerte, de tal forma que ele não é contabilizado no balanço de massa. O efeito da concentração de sal é representado no parâmetro cinético de dessorção ( $k_d = k_{d0} \phi^{\beta}$ ). Além disso, o sal também é contabilizado na constante cinética de adsorção devido à mudança de atividade da molécula alvo na fase líquida ( $k_a = k_{a0} e^{\gamma \phi}$ ). O aumento na concentração de íons da fase líquida,  $\phi$ , reduz a solubilidade nessa fase, proporcional ao termo  $e^{\gamma \phi}$ . Já a dessorção é afetada pelo sal, proporcional ao fator  $\phi^{\beta}$  (KARLSSON *et al.*, 2004; KUMAR *et al.*, 2015).

### 2.5.3. Modelo de equilíbrio de associação

Esta abordagem teórica leva em conta de forma explícita a cinética dos processos de adsorção e dessorção, sem a necessidade de impor um equilíbrio nesses processos, como é feito nas isotermas de equilíbrio (BENEDINI *et al.*, 2020). Portanto, os três modelos mais empregados para descrever a interação moléculas, resina e modificador de fase móvel são explicados nos próximos subtópicos. Em seguida, a aplicação dos modelos

matemáticos é discutida para uma melhor compreensão do avanço da modelagem em desenvolvimento de processos cromatográficos e os seus desafios.

Uma proteína adsorve quando se associa a vários ligantes conectados covalentemente ao adsorvente (MOLLERUP, 2008). As interações entre proteína e fase sólida podem variar dependendo da configuração cromatográfica, nas eletrostáticas, o adsorvente desloca os contra-íons associados aos ligantes. Já nas hidrofóbicas, a adsorção acarreta uma associação reversível do componente com os ligantes para formar um complexo por interações apolares (MOLLERUP, 2008). Portanto, para biosseparação muitas vezes observa-se um comportamento complexo de eluição, caso em que o modelo mais adequado depende das características do sólido e do adsorvente e fase móvel (HUUK *et al.*, 2017; KOCH *et al.*, 2022).

Na cromatografia de troca iônica, o modelo cinético de Langmuir (Equação 10), que é baseado na disponibilidade de locais vagos para a ligação da molécula, não leva em consideração a troca de contra-íons.

$$\frac{\partial C_{s,i}}{\partial t} = k_a(q_s - C_{s,i})C_i - k_d C_{s,i}, \quad (10)$$

em que,  $q_s$  é a constante de saturação da partícula,  $k_a$  é a constante de adsorção e  $k_d$  é a constante de dessorção.

Em contrapartida, os modelos de deslocamento estequiométrico baseiam-se na troca estequiométrica de íons e contra-íons (KUMAR *et al.*, 2015). Neste caso, a adsorção de uma molécula  $i$  com a carga  $Z_i$  associa-se a ligantes  $L$  com carga  $Z_s$  deslocando  $v$  contra-íons  $S$  de carga  $Z_s$ , a qual ocorre quando a proteína se associa a vários ligantes imobilizados (Equação 11) como:



em que, o coeficiente estequiométrico ou carga característica ( $v$ ) é definido pela razão  $Z_i/Z_s$  (MOLLERUP, 2008; SANCHEZ-REYES *et al.*, 2021) e na notação da tese  $[L_{Z_s} S^{Z_s}]$  representa o ligante da fase sólida  $L$  associado ao íon,  $i^{Z_i}$  representa a molécula (adsorbato),  $S^{Z_s}$  o íon livre em solução líquida e  $[i^{Z_i} L_{Z_i}]$  a aproximação adsorbato-ligante, dada por interação de carga.

Geralmente, apenas os coeficientes de atividade das espécies de soluto são levados em consideração nesses modelos (SANCHEZ-REYES *et al.*, 2021). Assim, a constante

de equilíbrio termodinâmico para um único componente pode ser definida como (Equação 12):

$$K_{eq} = \frac{a_s^{\nu} \bar{a}_i}{\bar{a}_s^{\nu} a_i}, \quad (12)$$

no qual,  $a_s^{\nu}$  e  $a_i$  descrevem as atividades do contra-íon e da biomolécula na solução (*bulk*), respectivamente, e  $\bar{a}_s$  e  $\bar{a}_i$  representa o contra-íon e a biomolécula adsorvido no sólido.

Um dos modelos de deslocamento estequiométrico mais utilizados para cromatografia de troca iônica é o *Steric Mass-Action* (SMA). O modelo supõe que as superfícies internas dos poros são inicialmente cobertas com íons de sal para manter a eletroneutralidade. Neste caso, o equilíbrio pode ser representado como (Equação 13):

$$K_{eq} = \frac{\phi^{\nu_i} C_{s,i}}{\bar{\phi}_s^{\nu_i} C_i}, \quad (13)$$

em que,  $C_i$  é a concentração do  $i$ -ésima componente (adsorvente) na fase móvel,  $C_{s,i}$  é a concentração da  $i$ -ésima componente na fase sólida,  $\bar{\phi}_s$  é a concentração de sal disponível na fase sólida,  $\phi$  é a concentração de sal na fase móvel e  $\nu$  é a carga característica da biomolécula íons (KUMAR *et al.*, 2015). Assim, o balanço de massa para a  $i$ -ésima proteína na fase sólida do modelo de Langmuir pode ser representada como (Equação 14):

$$\frac{\partial C_{s,i}}{\partial t} = k_{a,i} C_i \bar{\phi}_s^{\nu_i} - k_{d,i} C_{s,i} \phi^{\nu_i}, \quad (14)$$

Embora concentração e sítio ativo sejam conceitos distintos, a analogia entre eles é aqui utilizada para explicar a modelagem. Na Equação 15, a concentração total de sal na fase estacionária ( $\phi_s$ ) é definida como a soma da concentração de sal disponível ( $\bar{\phi}_s$ ) e  $\sum_{i=1}^{Nc} C_{s,i} \sigma_i$  corresponde à concentração de sal na fase sólida, ou sítios ativos impedidos de se conectar a outra sitio devido a estrutura ligada, representada na Figura 7 (ALTERN *et al.*, 2023; GALLANT; KUNDU; CRAMER, 1995; KARLSSON *et al.*, 2004).

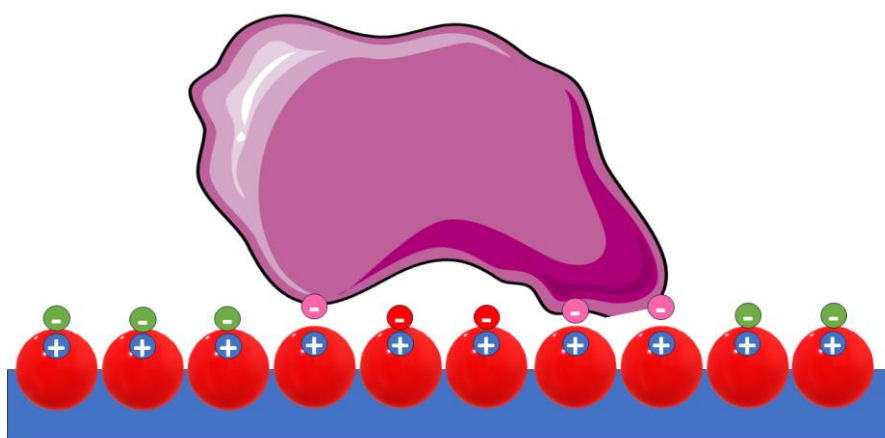
$$\phi_s = \bar{\phi}_s + \sum_{i=1}^{Nc} C_{s,i} \sigma_i, \quad (15)$$

A quantidade de sal indisponível para troca está representada por símbolos negativos na Figura 7, enquanto as disponíveis são indicadas em verde. Incorporando a eletroneutralidade na Equação 15 e considerando a capacidade iônica total ( $\Lambda$ ), ou seja, a quantidade total de sítios da fase estacionária, obtém-se a Equação 16.

$$\Lambda = \bar{\phi}_s + \sum_{i=1}^{Nc} (v_i + \sigma_i) C_{s,i}, \quad (16)$$

em que,  $\sigma_i$  e  $Nc$  são o fator de blindagem estérica e o número de componentes na mistura, respectivamente. Moléculas grandes com distribuições de carga de superfície complexas normalmente ocupam mais de um sítio de ligação e excluem sítios adicionais de ligação adicional por blindagem estérica ( $\sigma_i$ ) e a concentração de contra íons ( $\bar{\phi}_s$ ) não inclui íons de sal que são protegidos por moléculas ligadas (Lieres, 2010).

**Figura 7** - Representação da ligação de moléculas grandes a uma superfície catiônica. Círculo positivo azul: cargas na superfície sólida, Verde: sítio “livre” para troca do sal com uma carga da molécula, Rosa: sítio da molécula ligada a superfície sólida e Vermelho: Sítio indisponível para troca, contendo íons ligados. Adaptado (GALLANT; KUNDU; CRAMER, 1995; MELANDER; EL RASSI; HORVÁTH, 1989)



#### 2.5.4. Modelos matemáticos para previsão da retenção

Várias técnicas são utilizadas para prever a retenção da molécula alvo, ou simular a eluição dos componentes em um leito fixo (BESENHARD *et al.*, 2021; GRITTI, 2021; HADDAD; TARAJI; SZÜCS, 2021). Por muitos anos, abordagens tradicionais de planejamento experimental, tal como análises univariadas foram aliadas no desenvolvimento de métodos de purificação de produtos biotecnológicos. Como alternativa ao *One-Factor-at-a-Time* (OFaaT), a ferramenta multivariada *Design of Experiment* (DoE) surgiu para auxiliar a obtenção de respostas mais confiáveis (BEG, 2021; KASEMIIRE *et al.*, 2021).

A ferramenta sistemática do DoE aplica planejamento fatorial com princípios estatísticos para obter o máximo de informação possível, com número reduzido de experimentos (BEG, 2021). Na abordagem DoE, após a fase inicial de triagem e escolha

das variáveis mais importante, os modelos de superfície de resposta são os mais utilizados para otimização das condições experimentais (KASEMIIRE *et al.*, 2021)

Particularmente, a modelagem estatística baseada em métodos empíricos é facilmente implementada (STABY; RATHORE; AHUJA, 2017), o que talvez explique a popularidade das superfícies de resposta em esquema de planejamento, DoE (BARKER *et al.*, 2015; OSBERGHAUS *et al.*, 2012). Deste modo, o desenvolvimento do processo ainda ocorre de modo empírico, em outros casos, ainda se desenvolve por tentativa e erro (HOUDE; BERKOWITZ, 2019). Por outro lado, as limitações da modelagem empírica inviabilizam um tratamento geral, que atenda diversos tipos de cromatografia e moléculas alvo (RISCHAWY *et al.*, 2019; SHEKHAWAT; RATHORE, 2019; STABY; RATHORE; AHUJA, 2017).

Demais metodologias baseadas em modelos matemáticos têm ganhado destaque, como a modelagem fenomenológica e modelos baseados em descritores moleculares. Baseada nos fundamentos de transporte de massa, adsorção sólido-líquido os modelos fenomenológicos podem ser utilizados para extrair diversas informações cromatográficas (BESENHARD *et al.*, 2021; GRITTI, 2021). Os descritores, por outro lado, empregam relações matemáticas das estruturas e propriedades moleculares (químicas) para previsões cromatográficas (KALISZAN, 2007).

Apesar dos descritores moleculares possuírem uma finalidade teórica, geralmente são criados por modelos empíricos. O grau de informação que os descritores de fato trazem para a previsão do tempo de retenção ainda é questionada, uma vez que muitos deles são redundantes ou mesmo de utilidade questionável para a correlação desejada. Deste modo, a aplicação de descritores moleculares ainda é pouco compreendida (BESENHARD *et al.*, 2021; KALISZAN, 2007). Para prever a retenção com precisão, é necessário um conjunto considerável de descritores, em que ganham importância técnicas de redução de dimensionalidade. Além disso, modelos preditivos requerem treinamentos (ajustes) utilizando moléculas modelo, o que é uma tarefa desafiadora no caso de biomoléculas (BESENHARD *et al.*, 2021; KALISZAN, 2007).

No quesito experimental, a complexidade dos efeitos termodinâmicos e cinéticos, das interações entre os componentes da mistura e as fases móvel e estacionária, além dos efeitos de transporte de massa ao longo da coluna, dificulta a compreensão dos fenômenos envolvidos (BESENHARD *et al.*, 2021; GOLSHAN-SHIRAZI; GUIOCHON, 1994; GUIOCHON *et al.*, 2006; SHEKHAWAT; RATHORE, 2019). Por outro lado, a

modelagem matemática possui grande potencial na obtenção de informações sobre o mecanismo de separação, sendo assim, uma importante ferramenta para redução do esforço experimental (BESENHARD *et al.*, 2021; GUIOCHON *et al.*, 2006; SHEKHAWAT; RATHORE, 2019).

Modelos baseados em fenômenos físico-químicos e de transporte predizem com maior robustez o comportamento do sistema, principalmente no que se refere à possibilidade de generalização e extrapolação, incluindo a utilidade para uma ampla faixa de condições de processo (GUIOCHON *et al.*, 2006; SHEKHAWAT; RATHORE, 2019). No entanto, com frequência e a depender das equações envolvidas, soluções para esses modelos requerem maior esforço computacional. Além disso, determinar experimentalmente parâmetros do modelo de modo a manter a interpretação física consistente pode se tornar um obstáculo. No âmbito da cromatografia, são essenciais os procedimentos de “calibração dos modelos”, tais quais frequentemente são conhecidos na literatura como protocolos de determinação independente ou ajuste de parâmetros necessários à simulação (GUIOCHON *et al.*, 2006; HARRISON *et al.*, 2015; SHEKHAWAT; RATHORE, 2019; STABY; RATHORE; AHUJA, 2017).

A simulação numérica utilizando modelos fenomenológicos auxilia a compreensão dos fenômenos envolvidos no processo cromatográfico (GU, 2015; GUIOCHON *et al.*, 2006; HARRISON *et al.*, 2015), o que amplia o interesse no tema. Além do interesse acadêmico, a modelagem fenomenológica possui desdobramentos práticos e impacto econômico no desenvolvimento de bioprocessos (KUMAR *et al.*, 2015), que naturalmente é dependente de novos produtos e avanços tecnológicos permanentes.

Dada a importância significativa e os desafios associados ao uso de modelos fenomenológicos, a seção seguinte é dedicada à apresentação dos modelos mais citados na literatura, destacando suas respectivas vantagens e limitações.

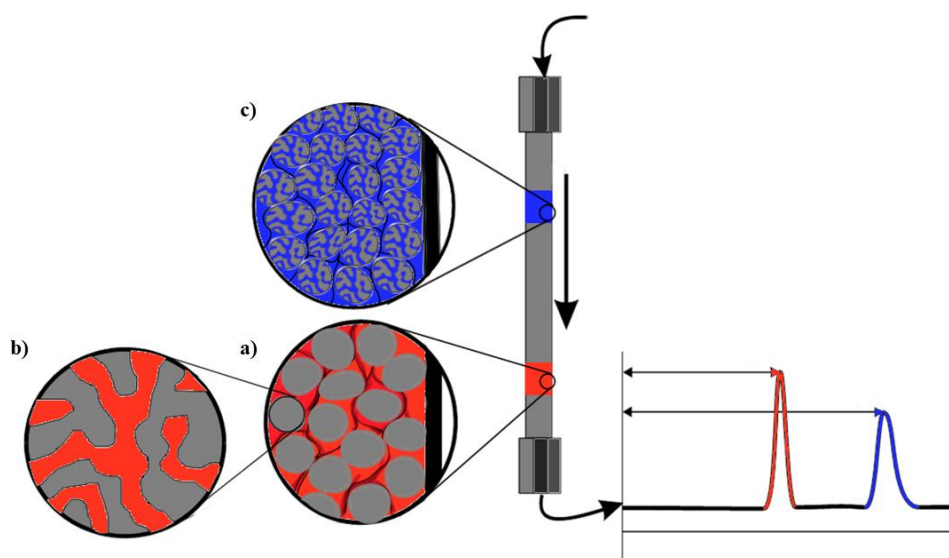
## **2.6. Principais modelos fenomenológicos para cromatografia preparativa**

Na cromatografia líquida, o transporte de massa de moléculas de soluto para o adsorvente pode ser dividido em dois níveis. O primeiro é o transporte da massa do volume intersticial para o contorno das partículas sólidas adsorventes (Figura 8a). Este fenômeno ocorre por difusão mássica no filme externo. No segundo nível, os componentes são transportados pela estrutura porosa interna às partículas à medida que

são adsorvidos na superfície sólida (Figura 8b). Nesse caso, o mecanismo de difusão superficial também contribui com o processo (SHEKHAWAT; RATHORE, 2019).

A Figura 8 representa o escoamento da fase móvel no leito empacotado, no qual durante o processo de escoamento na região intersticial (Figura 8a), ocorre também o transporte mássico correspondente à dispersão axial no leito, que ocasiona efeito de espalhamento de bandas ou picos na direção longitudinal. A dispersão axial ocorre pelos efeitos difusivos moleculares, mas que são afetados pelo escoamento nos poros, principalmente determinada pela tortuosidade do escoamento intersticial (GOLSHAN-SHIRAZI; GUIOCHON, 1994; GUIOCHON *et al.*, 2006; SHEKHAWAT; RATHORE, 2019).

**Figura 8** - Escoamento da fase móvel no leito empacotado: (a) escoamento intersticial, (b) escoamento no poro e (c) escoamento total, interstício e poro (quando o leito é considerado um monólito)



Alguns problemas teóricos em cromatografia preparativa são muito discutidos na literatura, principalmente para cromatografia não linear. Entre os problemas, estão os estudos da homogeneidade, estabilidade, alimentação viscosa, separação de multicomponentes e na escolha da isoterma de equilíbrio, entre elas, a isoterma de Langmuir (GUIOCHON *et al.*, 2006; HARRISON *et al.*, 2015; JANSON, 2011; ŁACKI, 2014; SHEKHAWAT; RATHORE, 2019; STABY; RATHORE; AHUJA, 2017). Os termos cromatografia linear e não linear são frequentemente utilizados na literatura e estão diretamente relacionados à isoterma de equilíbrio.

Na cromatografia linear, o equilíbrio é definido pela proporcionalidade entre a concentração na fase sólida e a concentração na fase móvel (lei de Henry). Entretanto, na cromatografia não linear, comportamentos mais complexos são esperados, como a saturação da superfície prevista pela isoterma de Langmuir. Por consequência, existe um efeito de concentração na frente da banda para isoterma favorável (efeito “*self-sharpening*”), o que não corresponde a perfis gaussianos. Assim, em termos experimentais e em sobrecarga, existem efeitos termodinâmicos sobre a forma do pico e também a influência da presença dos demais componentes na solução. Em termos mecânicos, a tendência é que os efeitos de espalhamento axial promovido pelo transporte de massa contraponham os efeitos de “*self-sharpening*” ao longo da coluna. Em sua grande maioria, a cromatografia para purificação (ou cromatografia preparativa) assume características não lineares (GOLSHAN-SHIRAZI; GUIOCHON, 1994; GUIOCHON *et al.*, 2006).

Os principais modelos fenomenológicos abordados na literatura para cromatografia líquida estabelecem em geral algumas suposições comuns (GU, 2015; GUIOCHON *et al.*, 2006; SHEKHAWAT; RATHORE, 2019):

- a compressibilidade volumétrica é desconsiderada em ambas as fases;
- a resistência à transferência de calor entre as fases móvel e estacionária é desprezível na maioria dos casos, o que associado à baixa entalpia de adsorção, leva a um processo isotérmico;
- os gradientes de concentração na direção radial da coluna são desprezíveis.

No geral, esses modelos assumem que as colunas são bem empacotadas, o que aliado às características geométricas das colunas tornam o efeito da heterogeneidade radial pouco significativo (GU, 2015; GUIOCHON *et al.*, 2006). Apesar de existirem modelos que consideram uma coluna radialmente heterogênea (GU, 2015; GUIOCHON *et al.*, 2006), os modelos se tornam mais complexos e os parâmetros de mais difícil estimativa, frequentemente correlacionados (GUIOCHON *et al.*, 2006).

Os modelos de origem em balanço de massa serão tratados aqui como fenomenológicos. Apesar disso, vale a ressalva de que é possível que os parâmetros percam a interpretação física ou que assumam o papel de parâmetros agrupados (efetivos) quando ajustados a partir de dados experimentais.

A partir das hipóteses mencionadas, segue o panorama geral dos modelos fenomenológicos mais estudados para cromatografia preparativa:

- modelo ideal (*Ideal Model*, IM);
- modelo equilíbrio-dispersivo (*Equilibrium-Dispersive Model*, EDM).
- modelo cinético agrupado (*Lumped Kinetic Model*, LKM);
- modelo geral de taxa (*General Rate Model*, GRM);

Sendo que o último modelo é o único a possuir duas equações, uma para cada fase.

### 2.6.1. Definições importantes para modelagem fenomenológica

Na literatura sobre modelagem de colunas cromatográficas, a definição de porosidade do leito e velocidade do fluido podem variar conforme o autor. Portanto, esclarecer qual definição é utilizada neste trabalho para essas variáveis é de extrema importância (GUIOCHON *et al.*, 2006; SHEKHAWAT; RATHORE, 2019; STABY; RATHORE; AHUJA, 2017).

#### 2.6.1.1. Porosidade da coluna empacotada

Modelos mais simples da cromatografia englobam os interstícios do empacotamento de resinas (Figura 8a) e a porosidade interna às partículas (Figura 8b) como um só meio poroso (Figura 8c), representado pela porosidade total ( $\varepsilon_T$ ). A porosidade intersticial ( $\varepsilon_I$ ), também conhecida como “porosidade externa”, é definida pela Equação 17, ou seja, pela razão entre o volume do interstício ( $V_I$ ) e o volume total da coluna ( $V_C$ , também chamado de volume geométrico da coluna) (GUIOCHON *et al.*, 2006).

$$\varepsilon_I = \frac{V_I}{V_C} \quad (17)$$

A porosidade das partículas ( $\varepsilon_p$ ), Equação 18 é definida pela razão entre o volume do poro ( $V_{\text{poro}}$ , representando os volumes de poro intrapartícula) e o volume da partícula, ou volume ocupado pelas partículas no leito, assim,  $V_{\text{partícula}} = V_C - V_I$ .

$$\varepsilon_p = \frac{V_{\text{poro}}}{V_{\text{partícula}}} \quad (18)$$

A porosidade total inclui a porosidade intersticial acrescida da porosidade das partículas. Pressupondo que todo o ar eventualmente presente no empacotamento tenha sido expulso do meio poroso, a definição da porosidade total é representada pela razão entre o volume da fase móvel ( $V_m$ ), ou fase líquida, e o volume total da coluna, Equação 19 (GUIOCHON *et al.*, 2006).

$$\varepsilon_T = \frac{V_m}{V_C} \quad (19)$$

$$\varepsilon_T = \frac{V_I + V_{poro}}{V_C} = \frac{V_I}{V_C} + \frac{\varepsilon_p V_{particula}}{V_C} = \varepsilon_I + \varepsilon_p (1 - \varepsilon_I) \quad (20)$$

### 2.6.1.2. Velocidade que o fluido percola a coluna

Pela compressibilidade desprezível dos líquidos e assumindo um processo isotérmico, a vazão volumétrica da fase móvel ( $Q$ ) é constante ao longo do sistema. Assim, a velocidade superficial ( $u_S$ ) pode ser determinada facilmente, dependente da vazão volumétrica e da área de secção da coluna (área superficial ou geométrica,  $A_C$ ), Equação 21 (GUIOCHON *et al.*, 2006; HARRISON *et al.*, 2015).

$$u_S = \frac{Q}{\pi r_c^2}, \quad (21)$$

no qual,  $r_c$  é o raio da coluna. A velocidade linear ( $u_L$ ) está relacionada ao tempo de residência de compostos não retidos, mas capazes de penetrar nos poros das partículas. Então,  $u_L$  é calculado pela velocidade superficial dividida pela porosidade total do empacotamento, Equação 22. A velocidade linear pode ser definida experimentalmente pela razão do comprimento percorrido ( $L$ ) pelo tempo que um traçador (não retido) percola a coluna ( $t_T$ , *hold-up time*) (GUIOCHON *et al.*, 2006; HARRISON *et al.*, 2015).

$$u_L = \frac{u_S}{\varepsilon_T} = \frac{L}{t_T} \quad (22)$$

Na velocidade intersticial ( $u_I$ ) a área contabilizada é a dos interstícios, que pode ser definida pela Equação 23.

$$u_I = \frac{u_S}{\varepsilon_I}. \quad (23)$$

### 2.6.2. Modelo ideal (IM)

Os modelos mais simples são os que possuem somente uma equação para descrever o perfil de concentração de um componente através da coluna (Equação 24). Todo

desenvolvimento matemático para obtenção da Equação 24 pode ser consultado em *B. I. I. Balanço de massa para modelos de uma equação*.

$$\frac{\partial C_i}{\partial t} + \frac{(1-\varepsilon_T)}{\varepsilon_T} \frac{\partial C_{s,i}}{\partial t} = D_{L,i} \frac{\partial^2 C_i}{\partial z^2} - u_L \frac{\partial C_i}{\partial z} \quad (24)$$

Na Equação 24 pode ser denominada de equação convectiva-dispersiva ou também de “equação de transporte do componente i”. Nela,  $C_i$  corresponde à concentração na fase móvel e  $C_{s,i}$  à concentração do componente i na fase estacionária,  $D_{L,i}$  à dispersão axial do componente i,  $t$  ao tempo e  $z$  à posição na coluna. O termo dispersivo (relacionado ao  $D_{L,i}$ ) procura incluir os efeitos de espalhamento pelo transporte de massa nos interstícios, enquanto o termo de  $u_L \frac{\partial C_i}{\partial z}$  inclui o transporte advectivo da fase móvel (GUIOCHON *et al.*, 2006; SHEKHAWAT; RATHORE, 2019).

O termo de dispersão axial está relacionado ao modo com que os componentes permeiam os interstícios ao longo da coluna, causando efeitos de espalhamento que são devido à combinação da difusão da molécula na direção longitudinal e da diferença de velocidade com que ela pode atravessar um leito empacotado ao considerar diversos caminhos. Esses efeitos da tortuosidade na dispersão axial também são mencionados na bibliografia como *eddy diffusion*. Essa combinação de efeitos é independente dos mecanismos de transporte de massa para dentro da partícula e das outras contribuições de origem cinética para o alargamento da banda (GUIOCHON *et al.*, 2006).

A velocidade do termo advectivo utilizada aqui é a velocidade linear, também conhecida como “velocidade cromatográfica” definida pela Equação 22, cuja definição de velocidade foi detalhada na seção 2.6.1.2 (GUIOCHON *et al.*, 2006; HARRISON *et al.*, 2015; SHEKHAWAT; RATHORE, 2019). A porosidade total ( $\varepsilon_T$ ) normalmente é empregada para os modelos de uma equação, no qual engloba toda porosidade intersticial e do poro dentro da coluna (empacotamento), o que está descrito em maiores detalhes na seção 2.6.1.1 (GUIOCHON *et al.*, 2006; HARRISON *et al.*, 2015; SHEKHAWAT; RATHORE, 2019).

Guiochon *et al.* (2006) classificam as hipóteses envolvidas na modelagem matemática da coluna como cromatografia ideal ou não ideal. No modelo ideal (Equação 25), supõe-se que as fases móvel e estacionária estejam em equilíbrio a cada seção da coluna. Assim, nesse caso, o termo da concentração na fase sólida ( $C_{s,i}$ ) é definido pela

própria isoterma de equilíbrio ( $q_i$ , Equação 3), isto é  $C_{s,i} = q_i$  (GUIOCHON *et al.*, 2006; SHEKHAWAT; RATHORE, 2019).

Neste modelo, todos os efeitos de transportes são desprezados e o equilíbrio termodinâmico é responsável pela posição e formato do pico (GOLSHAN-SHIRAZI; GUIOCHON, 1992; GUIOCHON *et al.*, 2006; STABY; RATHORE; AHUJA, 2017).

$$\frac{\partial C_i}{\partial t} + \frac{(1-\varepsilon_T)}{\varepsilon_T} \frac{\partial q_i}{\partial t} + u_L \frac{\partial C_i}{\partial z} = 0 \quad (25)$$

O modelo é importante para o caso não linear, pois o formato dos picos de altas concentrações são essencialmente controlados pelo equilíbrio quando usadas colunas relativamente curtas. Deste modo, é possível estudar a influência da termodinâmica nesses perfis, independentemente da influência da cinética de transferência de massa (GUIOCHON *et al.*, 2006; SHEKHAWAT; RATHORE, 2019). Entretanto, à medida que a massa percorre a coluna, existe a influência dos vários efeitos relacionados à transferência de massa, que incluem mecanismos moleculares de difusão e também devido ao escoamento da fase fluida (GUIOCHON *et al.*, 2006).

Desta forma, a utilização do modelo de cromatografia ideal contribui para a compreensão de alguns dos fenômenos da cromatografia preparativa, tais como, limites difusos e da forma do perfil sob condições de sobrecarga, ou seja, em uma cromatografia não linear (GOLSHAN-SHIRAZI; GUIOCHON, 1994; GUIOCHON *et al.*, 2006). No entanto, a difusão mássica é responsável pelo alargamento dos picos, em que os perfis de banda são mais suaves do que o previsto pelo modelo ideal, assim, o perfil de choque (íngreme) tende a desaparecer, substituído por um pico de formato mais próximo à curva Gaussiana (GOLSHAN-SHIRAZI; GUIOCHON, 1992; GUIOCHON *et al.*, 2006).

Na cromatografia linear, que se aproxima de uma injeção em condições analíticas, a forma do pico na alimentação permanece inalterada à medida que o componente é transportado pela coluna. Assim, para o modelo ideal linear, o pico é simplesmente deslocado e sofre os efeitos de retenção na coluna. Essa retenção é característica do componente e representada pelo parâmetro de equilíbrio da lei de Henry.

Nos modelos não ideais, a eficiência da coluna tem um valor finito e mensurável. Por isso, há vários modelos de cromatografia não ideal de uma equação, que serão apresentados nos próximos tópicos (GUIOCHON *et al.*, 2006). Estes modelos devem incluir fenômenos que são responsáveis pelo alargamento de banda, entre eles, a dispersão

axial, a cinética de transferência de massa e a cinética de adsorção (GOLSHAN-SHIRAZI; GUIOCHON, 1992; GUIOCHON *et al.*, 2006).

### 2.6.3. Modelo equilíbrio dispersivo (EDM)

Considerado o modelo não ideal mais simples, no EDM (Equação 26) o efeito termodinâmico, cinético e de transporte de massa é representado pela isoterma de equilíbrio (Equação 3) e pelo termo de dispersão aparente ( $D_a$ ) (GOLSHAN-SHIRAZI; GUIOCHON, 1992; GUIOCHON *et al.*, 2006). Diferentemente do coeficiente de dispersão axial ( $D_{L,i}$ ), o termo difusivo no EDM leva em conta todos os efeitos de espalhamento, incluindo o transporte de massa intersticial e também no interior das partículas, por isso a denominação “aparente” do coeficiente  $D_a$ .

$$\frac{\partial c_i}{\partial t} + \frac{(1-\varepsilon_T)}{\varepsilon_T} \frac{\partial q_i}{\partial t} + u \frac{\partial c_i}{\partial z} = D_a \frac{\partial^2 c_i}{\partial z^2}, \quad (26)$$

No EDM, a notação  $q_i$  é adotada do mesmo modo que para o modelo ideal (IM), no qual corresponde à concentração do componente  $i$  adsorvido na fase estacionária em equilíbrio com a fase móvel na seção da coluna. O equilíbrio em cromatografia líquida não linear costuma ser regido pela Equação 3.

Na prática, o modelo equilíbrio-dispersivo assume que as fases móvel e estacionária estão constantemente em equilíbrio e que efeitos devido aos desvios dessa hipótese podem ser agrupados em um termo de dispersão aparente. Além disso, no EDM pressupõe que os coeficientes de dispersão dos componentes permaneçam constantes, independentemente da concentração do soluto (GOLSHAN-SHIRAZI; GUIOCHON, 1992; GUIOCHON *et al.*, 2006; SHEKHAWAT; RATHORE, 2019; STABY; RATHORE; AHUJA, 2017).

Neste modelo, o equilíbrio de fases seria instantaneamente estabelecido a cada seção, isto é, considera-se a priori que o transporte de massa entre as fases é instantâneo, de resistência desprezível (GOLSHAN-SHIRAZI; GUIOCHON, 1992; GUIOCHON *et al.*, 2006). O conceito *Height Equivalent to a Theoretical Plate* (HETP) busca explicar, principalmente, o efeito do alargamento da banda observado no cromatograma. A terminologia, originária da análise da destilação, aproxima um cromatógrafo em uma série de tanques bem misturados, ou seja, em equilíbrio termodinâmico (HARRISON *et*

*al.*, 2015). Neste caso, o número de pratos (N), Equação 27, pode ser definido por meio das propriedades de uma curva gaussiana, Figura 6.

$$N = \frac{t_R^2}{\sigma^2} = \frac{t_R^2}{(w_b/4)^2} = \frac{L}{H}, \quad (27)$$

em que,  $t_R$ ,  $L$  e  $H$  são o tempo em que a molécula fica retida na coluna, comprimento da coluna e a altura da placa teórica, e as propriedades da gaussiana são o desvio padrão ( $\sigma$ ) e a largura do pico na base (interceptação das retas na base) ( $w_b$ ).

Quando relacionado  $D_a$  à teoria de número de pratos teóricos, o coeficiente de dispersão aparente pode ser representado pela Equação 28 (GOLSHAN-SHIRAZI; GUIOCHON, 1992; GUIOCHON *et al.*, 2006).

$$D_a = \frac{Hu_L}{2} = \frac{Lu_L}{2N}, \quad (28)$$

A altura do pico cromatográfico (H) é uma medida comumente empregada para a eficiência da coluna de condições cromatográficas de baixa carga, ou seja, amostras diluídas (GOLSHAN-SHIRAZI; GUIOCHON, 1992; GUIOCHON *et al.*, 2006).

#### 2.6.4. Modelos cinéticos agrupados (LKM)

Os modelos cinéticos agrupados já utilizam o balanço diferencial em uma secção da coluna cromatográfica (Equação 24) com o termo de acúmulo distribuído em porções distintas, uma para cada fase (GUIOCHON *et al.*, 2006; SHEKHAWAT; RATHORE, 2019). Os modelos podem ser divididos em modelo de transporte dispersivo ou de reação dispersiva (SHEKHAWAT; RATHORE, 2019), conforme o tratamento dado para o acúmulo na fase sólida, termo relacionado ao  $C_{s,i}$  (Equação 24).

##### 2.6.4.1. modelo de transporte dispersivo

No modelo de transporte dispersivo, a cinética da adsorção-dessorção é considerada instantânea, mas a cinética de transferência de massa não (GUIOCHON *et al.*, 2006). Em outras palavras, a cinética de adsorção-dessorção seria negligenciada, e o termo de acúmulo na fase estacionária seria calculado pelo transporte de massa (SHEKHAWAT; RATHORE, 2019). A Equação 29 representa o modelo de força motriz linear baseado no coeficiente global de transporte de massa,  $k_m$ , (GUIOCHON *et al.*, 2006), que inclui a

resistência da transferência de massa no filme da partícula adsorvente (GUIOCHON *et al.*, 2006; SHEKHAWAT; RATHORE, 2019).

$$\frac{\partial C_{s,i}}{\partial t} = k_m(C_i - C_i^*), \quad (29)$$

no qual,  $C_i^*$  é a concentração do componente  $i$  no líquido em equilíbrio com a fase estacionária a  $C_{s,i}$  e  $C_i$  a concentração do soluto da fase móvel. Outra forma de calcular o transporte é pelo modelo de força motriz linear no sólido, Equação 30.

$$\frac{\partial C_{s,i}}{\partial t} = k_f(C_{s,i}^* - C_{s,i}), \quad (30)$$

em que,  $C_{s,i}$  é a concentração do componente  $i$  adsorvido na partícula,  $k_f$  o coeficiente global de transferência de massa do modelo de força motriz linear no sólido e  $C_{s,i}^*$  a concentração do componente  $i$  na fase estacionária em equilíbrio com a fase móvel (GUIOCHON *et al.*, 2006; SHEKHAWAT; RATHORE, 2019).

#### 2.6.4.2. modelo de reação dispersiva

No modelo de reação dispersiva, considera-se que a cinética do processo de adsorção ou troca iônica é mais lenta que o transporte de massa entre as fases, assim, as contribuições das resistências de transferência de massa para o alargamento da banda seriam desprezíveis. Portanto, a concentração do componente  $i$  retido na fase estacionária ( $C_{s,i}$ ) é regida principalmente pelos modelos cinéticos. Como por exemplo, o modelo de adsorção de Langmuir (Equação 10).

#### 2.6.5. Modelo geral de taxa (GRM)

O modelo fenomenológico mais detalhado é o modelo de taxa geral, que busca descrever individualmente os diversos mecanismos fundamentais que ocorrem em um processo de cromatografia: a convecção, dispersão axial, transporte de espécies para dentro e fora das partículas e a difusão de espécies pelos poros das partículas (GUIOCHON *et al.*, 2006; STABY; RATHORE; AHUJA, 2017). Além das suposições gerais apresentadas para os principais modelos matemáticos, duas considerações adicionais são muito importantes, sendo elas:

- o fluido dentro dos poros de partículas está estagnado, ou seja, não há fluxo convectivo,

- os parâmetros de transferência de massa são independentes da posição na coluna e do tempo de operação (GU, 2015).

A princípio o modelo geral considera separadamente as duas frações da fase móvel: a fração que percola os interstícios da coluna (Equação 31) e a fração estagnada (Equação 32), contida nos poros das partículas porosas (GUIOCHON *et al.*, 2006). Ao considerar geometria esférica para as partículas no leito tem-se:

$$\frac{\partial C_i}{\partial t} + \frac{(1-\varepsilon_I)}{\varepsilon_I} a_p k_c \left[ C_i - C_{p,i} \Big|_{r=r_p} \right] = D_{L,i} \frac{\partial^2 C_i}{\partial z^2} - \frac{u_S}{\varepsilon_I} \frac{\partial C_i}{\partial z}, \quad (31)$$

$$\frac{\partial C_{p,i}}{\partial t} + \frac{(1-\varepsilon_p)}{\varepsilon_p} \frac{\partial C_{s,i}}{\partial t} = \frac{D_{efetiva}}{\varepsilon_p} \left[ \frac{1}{r^2} \frac{\partial}{\partial r} \left( r^2 \frac{\partial C_{p,i}}{\partial r} \right) \right], \quad (32)$$

em que  $a_p$  é a área superficial externa às partículas por unidade de volume,  $k_c$  o coeficiente de transferência de massa de película (do seio do fluido para a partícula),  $C_i$  a concentração do componente  $i$  na fase móvel na região intersticial,  $C_{p,i}$  a concentração do componente  $i$  na fase móvel dentro da partícula,  $r_p$  o raio da partícula,  $D_{L,i}$  a dispersão axial do componente  $i$ ,  $t$  o tempo,  $z$  a posição na coluna,  $r$  a posição na partícula,  $C_{s,i}$  a concentração do componente  $i$  na fase estacionária e  $D_{efetiva}$  a difusividade efetiva. A concentração do componente  $i$  retido na fase estacionária é regida pelos modelos cinéticos de adsorção, um exemplo, a Equação 10 (GU, 2015; GUIOCHON *et al.*, 2006; SHEKHAWAT; RATHORE, 2019):

A difusividade efetiva descreve os mecanismos de difusão dos componentes nos poros ( $D_p$ ), incluindo a difusão de superfície ( $D_s$ ), assim (GUIOCHON *et al.*, 2006),  $q_{p,i}$  é a concentração do componente  $i$  na fase estacionária em equilíbrio com a fase móvel no interior do adsorvente.

$$D_{efetiva} = \varepsilon_p D_p + (1 - \varepsilon_p) D_s \frac{\partial q_{p,i}}{\partial C_{p,i}}, \quad (33)$$

Deste modo, poderíamos representá-la de modo geral para cromatografia líquida pela isoterma de equilíbrio de Langmuir, Equação 3, no qual  $b$  é a constante de equilíbrio  $b = k_a/k_d$  (GUIOCHON *et al.*, 2006).

O modelo geral de taxa se torna bastante complexo quando se utilizam equações para equilíbrio não lineares, principalmente para misturas de múltiplos componentes. Diante disso, não é possível assumir que os picos cromatográficos desses componentes são independentes como na isotermas de equilíbrio lineares (GOLSHAN-SHIRAZI; GUIOCHON, 1992). A inclusão dos vários parâmetros cinéticos relacionados à adsorção

e transporte de massa requerem a determinação independente de muitos parâmetros. Assim, é necessária a aquisição de dados de perfil de banda em ampla gama de condições experimentais (GUIOCHON *et al.*, 2006). Além disso, os custos computacionais para resolução numérica do modelo são elevados.

### **2.7. Solução matemática dos modelos fenomenológicos para simulação de colunas cromatográficas**

A simulação cromatográfica utilizando modelos fenomenológicos está cada vez mais sendo abordada na literatura (DE LUCA *et al.*, 2020; JAVEED *et al.*, 2011; RISCHAWY *et al.*, 2019; SANCHEZ-REYES *et al.*, 2021; VON LIERES; ANDERSSON, 2010). Apesar do modelo geral de taxa (GRM, com duas equações de transporte) ser bastante abordado na literatura (HAHN *et al.*, 2015; KUMAR *et al.*, 2015; OSBERGHAUS *et al.*, 2012b), a quantidade de parâmetros cujas medidas experimentais são necessárias pode dificultar sua aplicação no desenvolvimento de métodos cromatográficos. Em contrapartida, modelos com apenas uma equação de transporte já foram abordados para diversas configurações cromatográficas e podem representar bem diversos sistemas. O EDM para cromatografia de interação hidrofóbica ou fase reversa (ÅSBERG *et al.*, 2013; DE LUCA *et al.*, 2020; WANG, Gang; HAHN; HUBBUCH, 2016) e o LKM para cromatografia de troca iônica (KARLSSON *et al.*, 2004; SANCHEZ-REYES *et al.*, 2021) ganham destaque.

As equações diferenciais parciais (como exemplo as Equações 24 e 26) podem ser discretizadas na posição da coluna ( $z$ ), gerando equações diferenciais ordinárias. À priori, é possível utilizar distintos métodos de discretização na solução da equação diferencial de balanço: diferenças finitas, elementos finitos ou volumes finitos (GOLSHAN-SHIRAZI; GUIOCHON, 1992, 1994; GUIOCHON *et al.*, 2006; JAVEED *et al.*, 2011; MEDI; AMANULLAH, 2011).

O método por volumes finitos é fortemente discutido na literatura pelo potencial de resolver descontinuidades numéricas. Entre as principais vantagens estão a precisão de alta ordem em grades grosseiras (poucos pontos discretos), por exemplo, evitando difusão e dispersão numérica que podem levar a soluções incorretas (JAVEED *et al.*, 2011, 2012; MEDI; AMANULLAH, 2011; QAMAR *et al.*, 2016), ao menos quando associado esquema de interpolação adequado. Neste caso, o cálculo das faces foi ajustado para evitar

instabilidades características de um problema difusivo-advectivo (JAVEED *et al.*, 2011; MEDI; AMANULLAH, 2011), como é o caso da cromatografia.

Os métodos de interpolação das faces dos volumes finitos mais abordados são o *Upwind* de primeira ordem (Equações 99, 100 e 101 do Apêndice B.1.1.), o de segunda ordem *kappa* (Equações 102, 103 e 104) e métodos de altas ordem TVD pelas Equações 105, 106 e 107. Nos métodos de alta ordem, sobrepõe-se um limitador de fluxo para a interpolação. Os principais limitadores de fluxo estão descritos na Tabela 1 (JAVEED *et al.*, 2011, 2012; MEDI; AMANULLAH, 2011; QAMAR *et al.*, 2016).

**Tabela 1** - Limitadores de fluxo para os métodos TVD

Limitador de fluxo	Fórmula
Koren	$\Phi(r_j) = \max\left(0, \min\left(2r_j, \min\left(1/3 + 2/3 r_j, 2\right)\right)\right)$
Superbee	$\Phi(r_j) = \max\left(0, \min(2r_j, 1), \min(r_j, 2)\right)$
Minmod	$\Phi(r_j) = \max\left(0, \min(1, r_j)\right)$

Uma vez discretizados na posição da coluna, os integradores precisam ser aplicados para resolver o problema de integração numérica no tempo. Um dos integradores mais utilizados em soluções gerais é o Runge-Kutta de quarta ordem (CHERNEV; VANDE WOUWER; KIENLE, 2020; JAVEED *et al.*, 2011, 2012; MEDI; AMANULLAH, 2011; QAMAR *et al.*, 2016). Entretanto, também é possível encontrar outros solucionadores de distintas ordens e passo variável, tal como o método *Backward Differentiation Formulas* (BDF). Além disso, há métodos recomendado para problemas rígidos, *stiff* (CHERNEV; VANDE WOUWER; KIENLE, 2020; JAVEED *et al.*, 2012).

Para solução desses problemas, condições de contorno devem ser estabelecidas. Normalmente se utilizam condições de vaso fechado (JAVEED *et al.*, 2011, 2012; RISCHAWY *et al.*, 2019).

### 2.7.1. Condições de contorno para entrada e saída da coluna

Na primeira face da coluna, as condições de contorno geralmente implementadas são as de função prescrita e as de Danckwerts (GUIOCHON *et al.*, 2006; JAVEED *et al.*, 2011; RISCHAWY *et al.*, 2019). A condição de “função prescrita” é reconhecida nas entradas ( $C_{feed}$ ) e internamente ao programa desenvolvido pela denominação “pulso retangular”. O termo mencionado está relacionado à hipótese de função prescrita para o contorno, não ao comportamento da concentração na entrada em função do tempo. Assim,

a implementação é capaz de simular qualquer função de concentração com o tempo na entrada. Nesse caso, se aplica a injeção ( $C_{inj}$ ) igual a injeção do componente  $i$  na entrada da coluna (Equações 34, 35 e 36), conhecido como condição de contorno de vaso fechado. Já na condição de saída, a concentração que sai da coluna ( $C_{saída}$ ) é igual à do último nó  $C_{saída} = C_i(z = L, t)$ .

$$C_{feed}(z, t = 0) = 0; \quad 0 \leq z \leq 1, \quad (34)$$

$$C_{feed}(z = 0, t) = C_{inj}; \quad 0 \leq t \leq t_{inj}, \quad (35)$$

$$C_{feed}(z = 0, t) = 0; \quad t_{inj} < t. \quad (36)$$

Diferentemente da condição de contorno anterior, a de Danckwerts considera os efeitos de dispersivos no balanço de massa da entrada da coluna, neste caso a Equação 35 é substituída pela Equação 37.

$$C_{feed}(z = 0, t) = C_{inj} + \frac{D_{L,i} \text{ ou } a (C_j - C_{feed})}{u_L \Delta z}; \quad 0 \leq t \leq t_{inj} \quad (37)$$

Com as condições de contorno devidamente estabelecidas, é possível executar soluções numéricas com precisão e eficiência. No campo da cromatografia, por exemplo, a simulação de picos cromatográficos é uma tarefa complexa que requer um alto grau de precisão (JAVEED *et al.*, 2011). Felizmente, existem várias plataformas disponíveis no mercado que são capazes de realizar essa tarefa. (HAHN *et al.*, 2015; LEWEKE; VON LIERES, 2018).

As plataformas computacionais auxiliam no desenvolvimento desses métodos, no entanto, o uso dessas ferramentas não são garantias contra armadilhas, como correlação entre parâmetros do modelo, utilização de modelo demasiadamente simples ou complexo para a abordagem necessária à aplicação, incertezas ou mesmo viés experimental ou estimativas de parâmetros imprecisas (RISCHAWY *et al.*, 2019). Todavia, um dos grandes desafios da área está na precisão e na representatividade física dos parâmetros de transporte de massa e adsorção (GUIOCHON *et al.*, 2006; LIETTA *et al.*, 2022). O que será discutido na próxima seção.

## 2.8. Estimação de parâmetros cromatográficos

Apesar dos avanços teóricos possibilitarem o aumento da capacidade preditiva, muitas vezes na cromatografia preparativa a busca por condições de processo ainda é feita

por métodos de tentativa e erro (BESENHARD *et al.*, 2021; DE LUCA *et al.*, 2020). Comumente design experimental e superfícies de resposta (DoE) são empregados para definir variáveis de processo (BEG *et al.*, 2017; BESENHARD *et al.*, 2021). Entretanto, este método não é muito superior ao de tentativa e erro, pois ambos exigem grande esforço experimental, ainda sem levar à robustez para extrapolações ou generalização de resultados (BESENHARD *et al.*, 2021).

Os modelos fenomenológicos em conjunto com dados experimentais contribuem para reduzir o número de experimentos na obtenção de condições ótimas de separação (GHORBANI *et al.*, 2022). No entanto, antes de utilizar um modelo para prever comportamentos cromatográficos, este deve ser calibrado e validado (HEYMANN *et al.*, 2022). Contudo, boas práticas de estimação precisam ser seguidas, no qual o problema a ser modelado, função objetivo (custo) e outros requisitos relevantes devem ser cuidadosamente pensados (RISCHAWY *et al.*, 2019).

Ao decidir por um modelo fenomenológico, as hipóteses de seu desenvolvimento precisam ser discutidas (RISCHAWY *et al.*, 2019). Além disso, dentre as aplicações industriais de larga escala, erros sistemáticos, como atrasos de bombas (*Dwell volume*) e volumes mortos da coluna (*Dead volume*) podem influenciar na estimação parâmetros que não condizem com a realidade. O volume morto (*Dead*) é aquele ocupado pelo espaço entre a saída da coluna e o detector. Já o volume de retenção montante (*Dwell*) corresponde ao espaço entre o bombeamento de solventes e a entrada da coluna, o que inclui o volume de troca e mistura dos solventes que são utilizados no experimento. Assim, ao mudar o equipamento de separação (cromatógrafo), os modelos não são capazes mais de representar o processo (BERNAU *et al.*, 2022; GRITTI, 2021; HEYMANN *et al.*, 2022).

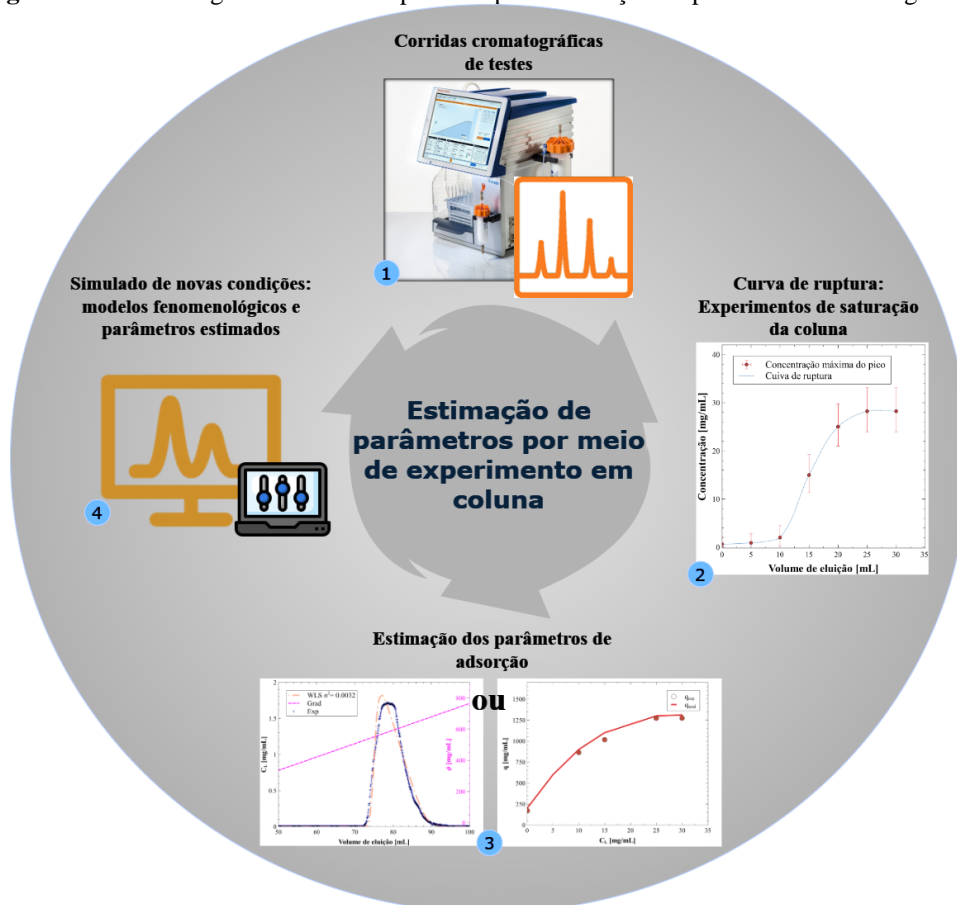
Parâmetros que representem ou quantifiquem com certa precisão os mecanismos físico-químicos são fundamentais para aplicação de modelos fenomenológicos na cromatografia industrial. Considerada uma das etapas mais demoradas, a estimação desses parâmetros pode ficar mais difícil à medida que a complexidade do modelo aumenta. Portanto, depois de discutir a necessidade do modelo a ser desenvolvido, baseando-se na aplicação (desenvolvimento de processo, otimização, aumento de escala, etc), a calibração do modelo é fundamental. Por calibração entende-se a obtenção dos parâmetros do modelo, por exemplo, pelo ajuste dos parâmetros a partir de

cromatogramas. Após a determinação dos parâmetros, também é relevante uma análise de sensibilidade e estimativa da incerteza dos parâmetros (RISCHAWY *et al.*, 2019).

Diferentes algoritmos de otimização (busca) são introduzidos para estimação de parâmetros de modelos fenomenológicos (HEYMANN *et al.*, 2022). Entre eles, estão os métodos Levenberg-Marquardt (LIETTA *et al.*, 2022), Simplex (DE LUCA *et al.*, 2020), algoritmo reflexivo da região de confiança (BRANCH; COLEMAN; LI, 1999; HEYMANN *et al.*, 2022), gradiente descendente e algoritmos genéticos (HEYMANN *et al.*, 2022; RISCHAWY *et al.*, 2019).

No desenvolvimento de métodos cromatográficos é comum alguns procedimentos para estimação de parâmetros de adsorção e de transporte de massa, as etapas estão representadas na Figura 9.

**Figura 9** – Metodologias usualmente aplicadas para estimação de parâmetros cromatográficos.



Caso não se tenha o conhecimento mínimo sobre a amostra a ser purificada, como solubilidade, afinidade, ponto isoelétrico e polaridade. Experimentos iniciais, em distintas colunas e condições de fase móvel, são muitas vezes o primeiro caminho para verificar as primeiras informações do método de separação a ser desenvolvido (Etapa 1 da Figura

9). Posteriormente, curvas de ruptura podem ser aplicadas para determinar condições de saturação da coluna (Etapa 2 da Figura 9), que geralmente são reproduzidas com uma quantidade pequena de experimentos. Assim, a estimação dos parâmetros de adsorção (Etapa 3 da Figura 9) pode sobrevir por isotermas de equilíbrio ou pelo método inverso (ÅSBERG *et al.*, 2013; DE LUCA *et al.*, 2020; HAGHPANAH *et al.*, 2011; LIETTA *et al.*, 2022). Por fim, os parâmetros estimados são utilizados para simular outras condições cromatográficas, o que também pode ser uma etapa de validação (Etapa 4 da Figura 9).

O ajuste dos parâmetros de modelos fenomenológicos a partir de cromatogramas é conhecido como “método inverso” e geralmente utiliza a soma quadrática dos resíduos do modelo frente aos dados experimentais como função a ser minimizada (melhor discutido nas seções 2.8.1 e 2.8.3). No geral, para calibração dos parâmetros de transporte de massa, experimentos de injeções tipo pulso são aplicadas (HEYMANN *et al.*, 2022; LIETTA *et al.*, 2022; RISCHAWY *et al.*, 2019).

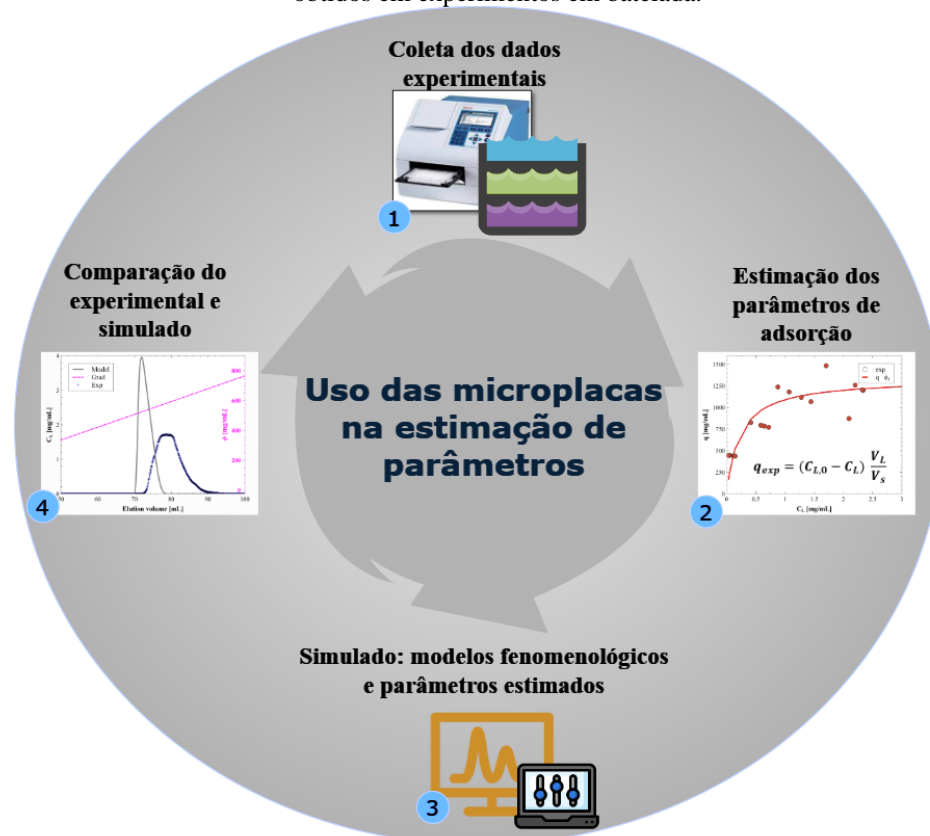
Nos parâmetros de isotermas de adsorção, geralmente duas abordagens são empregadas: ensaios em coluna e ensaios em batelada, sendo mais comum o de coluna. Neste caso, as curvas de ruptura experimentais são reproduzidas por cromatografia de análise frontal (ÅSBERG *et al.*, 2013; DE LUCA *et al.*, 2020; HAGHPANAH *et al.*, 2011; LIETTA *et al.*, 2022). Considerado um método dinâmico, esta abordagem é amplamente difundida porque requer uma quantidade mínima de testes de coluna (LIETTA *et al.*, 2022).

Por outro lado, experimentos em batelada está se tornando cada vez mais difundido, especialmente com novas tecnologias de alto rendimento (LIETTA *et al.*, 2022). Embora sejam considerados, na maioria das vezes, mais trabalhosos e forneçam menos informações (método estático) do que os testes de coluna, a grande quantidade de dados gerados (espaço amostral) e a redução no consumo de reagentes são fatores muito atrativos para o método em batelada (LIETTA *et al.*, 2022).

O procedimento habitual para estimação de parâmetros cromatográficos por meio de experimentos em batelada está esboçado na Figura 10 (ALTERN *et al.*, 2023; FIELD; KONSTANTINIDIS; VELAYUDHAN, 2017; LIETTA *et al.*, 2022; RAJENDRAN *et al.*, 2020; SHEKHAWAT *et al.*, 2023). No caso da miniaturização experimental (HTPD), a obtenção de uma grande quantidade de dados pode trazer dificuldades para modelagem, e não serem determinantes para ensaios em coluna (ALTERN *et al.*, 2023). Outro problema estão em como os dados são extraídos. Sendo assim, os dados obtidos,

geralmente, são referentes ao sobrenadante, ou não adsorvido (Etapa 1 da Figura 10). Estes são utilizados para estimação de parâmetros empregando modelos de adsorção (Etapa 2 da Figura 10), melhor detalhado na seção 2.8.2. Parâmetros estimados são validados por meio de modelos fenomenológicos (Etapa 3 da Figura 10) e validado por cromatogramas experimentais (Etapa 4 da Figura 10).

**Figura 10** - Procedimento comumente empregado para estimação de parâmetros por meio de dados obtidos em experimentos em batelada.



Na cromatografia preparativa, geralmente a forma do pico se desvia significativamente da simetria gaussiana (DE LUCA *et al.*, 2020; DONDI *et al.*, 2000). Assim, a estimação de parâmetros é dificultada devido à não linearidade de adsorção (DONDI *et al.*, 2000). Portanto, uma estimação com informações experimentais dos efeitos em coluna e batelada poderia ser uma alternativa para prever interações comportamento em coluna. Assim, é possível fazer uso dos dados de triagem em conjunto aos ensaios em coluna para prever o processo, o que garante melhor aproveitamento de dados, que de todo o modo costumam ser obtidos no desenvolvimento de processos de separação.

### 2.8.1. Estimação por mínimos quadrados

Para a estimativa dos parâmetros utilizando os dados em batelada e em coluna, o método dos mínimos quadrados ponderados (MQP) (Equação 38) pode ser aplicado (NELLES, 2020).

$$\min_{\underline{\theta}} \rightarrow \underline{f}^T \mathbf{W} \underline{f}, \quad (38)$$

em que  $\underline{\theta}$  é o vetor de parâmetros ( $p \times 1$ ),  $\underline{f}$  é o vetor de erros ( $N \times 1$ ) e  $\mathbf{W}$  é a matriz de pesos ( $N \times N$ ). No caso dos mínimos quadrados clássicos (MQC), a matriz de peso é a matriz de identidade ( $\mathbf{I}_{N \times N}$ ) (NELLES, 2020). Deste modo, a matriz de covariância dos parâmetros (Equação 39) pode ser escrita empregando a matriz  $\mathbf{B}$ , que é definida como a matriz da derivada de  $\underline{f}$  em relação a  $\underline{\theta}$ .

$$\mathit{cov}(\underline{\theta}) = (\mathbf{B}^T \mathbf{W} \mathbf{B})^{-1} \frac{\underline{f}^T \mathbf{W} \underline{f}}{(N-p)}, \quad (39)$$

A inferência do erro do modelo pode ser avaliada a partir da propagação linear da covariância do parâmetro, Equação 40 (NELLES, 2020).

$$\mathit{cov}(\hat{\underline{y}}) = \mathbf{X} \mathit{cov}(\underline{\theta}) \mathbf{X}^T, \quad (40)$$

em que  $\mathbf{X}$  é a matriz dos derivados do modelo com relação a  $\underline{\theta}$ .

### 2.8.2. Estimação de parâmetros empregando dados experimentais em batelada

Os parâmetros das isotermas podem ser obtidos por três abordagens experimentais de adsorção em batelada distintas, de modo a varrer as condições experimentais variando somente um fator (CASSOL *et al.*, 2014a; KOBER *et al.*, 2019, 2021). Na primeira, a variação da concentração inicial de adsorbato ( $C_{L,0}$ ) ocorre, enquanto o volume de solução líquida ( $V_L$ ) e massa de adsorvente sólido ( $M$ ) são mantidos constantes. As outras duas formas seriam variar  $V_L$  ou  $M$  mantendo  $C_{L,0}$ , constante. Uma organização mais precisa da situação seria definir  $C_{L,0}$  e a relação  $V_L/M$  como variáveis (KOBER *et al.*, 2021), pois é a razão  $V_L/M$  que define as concentrações de equilíbrio a serem obtidas para tempos longos de batelada e não  $V_L$  e  $M$  separadamente. A estratégia adotada nessa tese envolve variações da massa de resina ( $M$ ), que por sua vez levam a distintas concentrações experimentais em equilíbrio do soluto na fase líquida ( $C_L^{exp}$ ). A concentração

experimental na fase sólida ( $q^{exp}$ ) pode ser obtida diretamente pelo balanço de massa, Equação 41.

$$q^{exp} = (C_{L,0} - C_L^{exp}) \frac{V_L}{V_s}, \quad (41)$$

em que,  $V_s$  corresponde ao volume de sólido e possui a mesma base de cálculo para volume que  $q^{exp}$ , usualmente contabilizando o volume de partículas no sistema. A variável  $V_s$  está diretamente associada à massa de resina ( $M$ ), uma vez que correspondem à quantidade de resina da batelada, em termos volumétricos ou mássicos, respectivamente. Assim, o cálculo do  $V_s$  é definido pela massa de resina dividida pela sua densidade aparente  $V_s = M/\rho_{app}$ , uma vez que a massa de sólido é pesada para inclusão nos poços.

A alteração de  $V_L$  ou  $M$  mantendo  $C_{L,0}$  constante a cada batelada leva à alteração da razão  $V_L/V_s$ , que possui impacto sobre o balanço de massa da batelada (Equação 41) e assim desloca o equilíbrio obtido ao final do processo.

Uma maneira de estimar os parâmetros de adsorção ( $\theta$ ) é minimizar diretamente a soma dos quadrados dos resíduos (Equação 42) entre o modelo de isoterma de equilíbrio que estima a concentração no sólido ( $q^{mod}$ ) dado pela Equação 3 e a concentração adsorvida experimental ( $q^{exp}$ ), Equação 41 (KOBBER *et al.*, 2019).

$$f_i = [q_i^{exp} - q_i^{mod}], \quad (42)$$

em que, o  $i$ -ésimo elemento do vetor  $f$  calculado e  $q_i^{exp} = q_i^{exp}(C_{L,i}^{exp})$

Como a concentração do sobrenadante é a que de fato é mensurada, o procedimento de ajuste apresentado implica numa correlação direta entre  $q_i^{exp}$  usado e o valor medido de fato. De modo distinto, podemos substituir a Equação 3 no balanço de massa da Equação 41 e obter a Equação 45 para o cálculo da concentração no líquido em equilíbrio,  $C_L^{mod}$  (CASSOL *et al.*, 2014a; KOBBER *et al.*, 2019, 2021; TOLAZZI *et al.*, 2018).

$$C_{L,0}V_L = C_LV_L + qV_s, \quad (43)$$

$$bC_L^2 + C_L(1 + bq_s \frac{V_s}{V_L} - bC_{L,0}) - C_{L,0} = 0, \quad (44)$$

$$C_L^{mod} = \frac{-\beta + \sqrt{\beta^2 + 4C_{L,0}b}}{2b}, \quad (45)$$

em que,  $\beta$  é definido pela Equação 46.

$$\beta = 1 + bq_s \frac{V_s}{V_m} - bC_{L,0} \quad (46)$$

Sendo assim, a outra forma de estimação dos parâmetros em batelada é dada pela Equação 47, de modo que o valor escalar  $C_{L,i}^{mod}$  é estimado a partir da Equação 45 utilizando diretamente dados experimentais fixados no ensaio, ou seja, conhecidos a priori no experimento (são eles  $C_{L,0}$ ,  $V_L$  e  $V_S$ ).

$$f_i = [C_{L,i}^{exp} - C_{L,i}^{mod}] \quad (47)$$

Para a definição da função objetivo na Equação 47, os valores experimentais são obtidos para cada (i-ésimo elemento do vetor  $f$  calculado) concentração de equilíbrio ( $C_{L,i}^{exp}$ ).

### 2.8.3. Estimação de parâmetros a partir de experimentos em coluna

Existe a possibilidade de estimar todos os parâmetros  $\underline{\theta}$  de um cromatograma por meio da abordagem inversa, ou método inverso (FELINGER; ZHOU; GUIOCHON, 2003; FORSSÉN; ARNELL; FORNSTEDT, 2006; HAHN *et al.*, 2016). Nesse caso, o problema de otimização não linear pode ser resolvido tanto por CLS ou WLS.

A desvantagem da soma dos erros quadrados clássica está na extrema sensibilidade aos deslocamentos no tempo de retenção dos picos e não à forma dos cromatogramas (ajustados geralmente pela dispersão axial). Uma maneira de lidar com isso é usar WLS, o que proporciona mais sensibilidade à forma geral e mais tolerância a pontos iniciais não sobrepostos (HEYMANN *et al.*, 2022; LIU *et al.*, 2013). Para o MQC e o MQP,  $\underline{f}$  foi definido pelas Equações 48 e 49, respectivamente.

$$\underline{f} = \underline{e} \quad (48)$$

$$\underline{f} = \begin{bmatrix} \underline{e} \\ \underline{\tilde{\theta}} \end{bmatrix} \quad (49)$$

em que,  $\underline{e}$  é um vetor de resíduos  $N \times 1$  entre o cromatograma experimental ( $\underline{y}$ ) e o modelo do cromatograma ( $\underline{\hat{y}}$ ). O i-ésimo elemento do vetor  $\underline{y}$ ,  $\underline{\tilde{\theta}}$  é um vetor de desvio entre o parâmetro a ser estimado,  $\underline{\theta}$ , e os parâmetros conhecidos a priori,  $\underline{\hat{\theta}}$ , ou seja,  $\underline{\tilde{\theta}} = (\underline{\theta} - \underline{\hat{\theta}})$ . Para os mínimos quadrados ponderados, a matriz  $\mathbf{W}$  pode ser definida pela Equação 50 (NELLES, 2020).

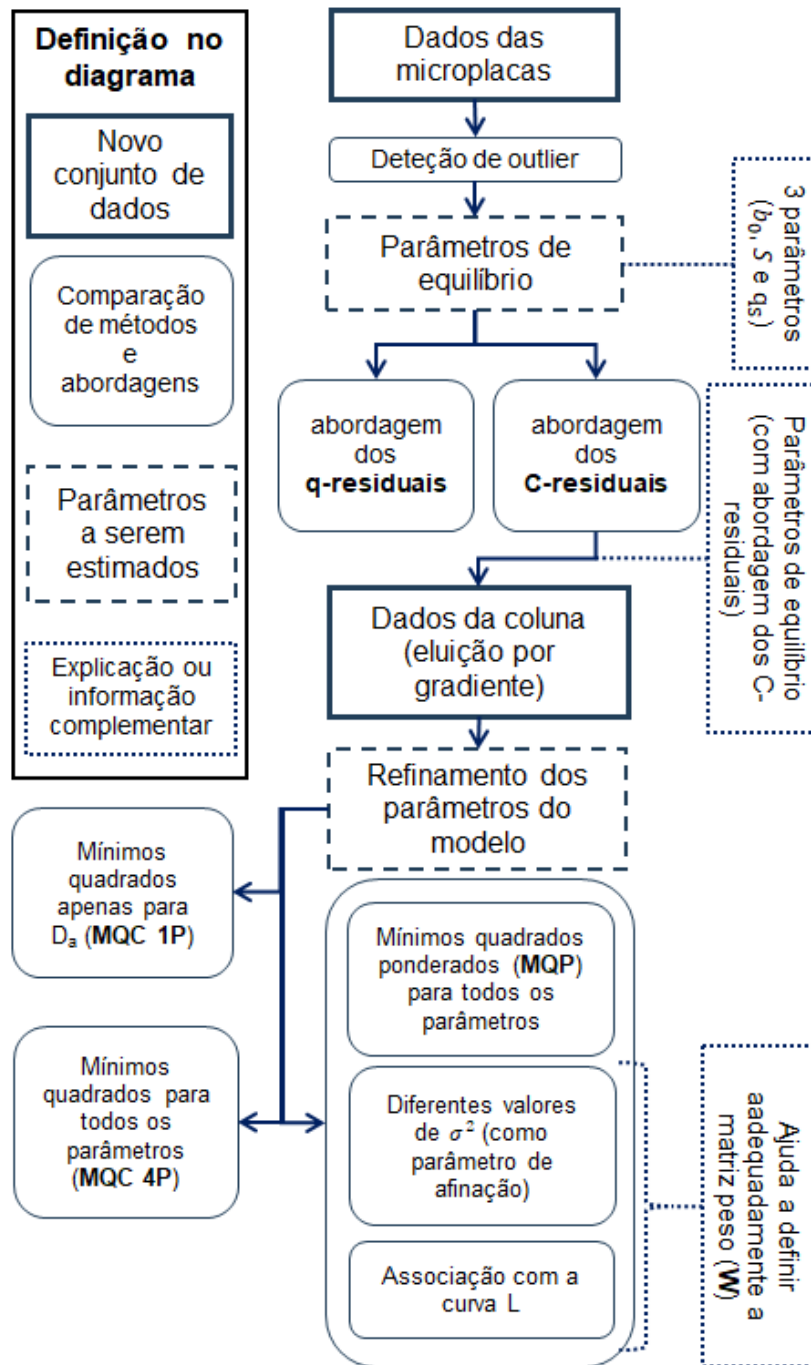
$$\mathbf{W} = \begin{bmatrix} \mathbf{W}_1 & \mathbf{0} \\ \mathbf{0} & \mathbf{W}_2 \end{bmatrix}, \quad (50)$$

em que  $W_1$  é o inverso teórico da covariância do erro/ruído do cromatograma e  $W_2$  o inverso da matriz de covariância dos parâmetros estimados dos experimentos com em batelada. Desta forma, o emprego os mínimos quadrados pesados (MQP) poderia ser a alternativa para uma estimativa conjunta dos ensaios em batelada e em colunas.

### 3. METODOLOGIA

Uma breve descrição da ferramenta computacional que foi desenvolvida está no decorrer do próximo tópico. Subsequente, a etapas e os aspectos do método proposto são apresentadas detalhadamente. O protocolo de desenvolvimento de métodos cromatográfico foi resumido da Figura 11.

**Figura 11-** Diagrama de fluxo da metodologia proposta que resume os passos para estimar os parâmetros.



A metodologia proposta segue os seguintes tópicos.

- I. **Aquisição de dados usando experimentos em microplacas e detecção de outliers:** os experimentos em microplacas foram empregados para triagem de resinas cromatográficas, em que esse método de baixo custo forneceu muitos dados ruidosos e podem estar sujeitos a outliers.
- II. **Estimativa de parâmetros a partir de microplacas com base apenas na concentração de líquido:** os dados obtidos em microplacas foram utilizados para estimação dos parâmetros de isoterma de equilíbrio. Embora muito usada na literatura sobre cromatografia, a formulação de mínimos quadrados perde seu significado estatístico quando a variável medida, sujeita a ruído, é definida como variável independente, como no caso da concentração adsorvida. Portanto, duas abordagens de estimação de parâmetros de isoterma foram comparadas.
- III. **Estimativa do parâmetro dispersivo e reestimativa dos parâmetros da isoterma usando o Modelo Dispersivo de Equilíbrio (EDM) e os mínimos quadrados ponderados:** O modelo EDM é uma das abordagens mais simples para representar uma coluna de cromatografia. Os resultados demonstraram que a aplicação dos mínimos quadrados ponderados (WLS) possibilita a integração dos dados obtidos em microplacas com os cromatogramas, visto que a curva L contribui para a definição da matriz de ponderação. Este protocolo foi comparado com outras abordagens de estimação dos mínimos quadrados clássica.

### 3.1. Simulador para o desenvolvimento de métodos cromatográficos

Um programa de computador foi codificado para auxiliar no desenvolvimento de métodos cromatográficos. A ferramenta de tomada de decisão foi desenvolvida na linguagem Python (versão 3.9.13) e tem como objetivo abranger o máximo de tipos de processos cromatográficos, com um foco especial para as cromatografias de interação hidrofóbica e de troca iônica. As principais bibliotecas utilizadas foram *numpy* (manipulação matricial, versão 1.21.5), *pandas* (manipulação de dados, versão 1.4.2) e *scipy* (solucionador numérico, versão 1.8.0).

No *Apêndice C*, as funcionalidades do programa são expostas em mais detalhes, complementadas com análises de velocidade, estabilidade e convergência da solução numérica, condições de contorno e a influência do modulador de fase (eluição de

gradiente) na resposta do simulador. No quesito simulação cromatográfica, a solução matemática utilizada, análise da convergência e instabilidade numérica, e a modelagem do modificador da fase móvel na coluna, estão descritos nos próximos subtópicos.

### **3.1.1. Solução matemática dos modelos fenomenológicos para simulação de colunas cromatográficas**

Os modelos implementados em código nas atividades de desenvolvimento da tese, e as descrições pertinentes estão nas seções 2.6.3, 2.6.4 e no *Apêndice B – Modelos fenomenológicos*. O modelo ideal (IM) não foi mais mencionado no texto pelo fato de ser muito parecido com EDM, porém desconsiderando os efeitos de transporte de massa ( $D_a = 0$ ).

A modelagem torna-se mais complexa ao representar os efeitos de alterações da fase móvel (eluição por gradiente). Nesse caso, o *Modelo de força do solvente linear (LSS)*, *Modelo de interação eletrostática e hidrofóbica (MPM)* e o modelo *Steric Mass-Action (SMA, seção 2.5.3)* foram empregados para incluir efeitos das interações hidrofóbicas (LSS e MPM) e troca iônica (MPM e SMA). No caso de utilizar o equilíbrio como hipótese, na estrutura algébrica do EDM, somente o LSS foi implementado.

Os principais métodos utilizados, de interpolação que seguiu à discretização da coluna, foram *Upwind*, *kappa*, *Koren*, *Superbee* e *Minmod* (Descritos na seção 2.7). O conjunto de equações diferenciais ordinárias obtidas após discretização no espaço (“Apêndice B.1.5.”) foram resolvidas no tempo pelos métodos implícitos BDF e Runge-Kutta para problemas rígidos (Radau), e os explícitos baseados no Runge-Kutta (RK45 e DOP853). As condições de contorno implementadas foram as de função prescrita e as de Danckwerts, descritas na seção 2.7.1.

### **3.1.2. Índice de Convergência da malha (GCI) e a instabilidade numérica**

O índice de convergência da malha (*Grid Convergence Index*, GCI) aplica a extrapolação de Richardson para estimar o erro de refinamento de uma simulação, no qual compara dois ou mais tamanhos de malha de discretização. A análise pode ser executada com duas ou três simulações de diferentes malhas, uma grosseira, uma média e uma refinada (VAN HOECKE *et al.*, 2023). Para comparação, arbitra-se uma variável  $y$  de monitoramento, que poderá apontar a melhoria da resposta da simulação com o

refinamento da malha. Por exemplo, em simulações CFD, o campo de velocidade do escoamento é resolvido, assim, é comum utilizar o módulo da velocidade em uma localidade de maior interesse ou a queda de pressão no equipamento. Deste modo, o primeiro passo foi verificar a ordem de convergência da malha (Equação 51), em que se escolheu de variável monitorada a largura do pico ao final da coluna (cromatograma). A largura de pico mencionada ( $w_b$  da gaussiana na Figura 6) foi obtido por ajuste de uma Gaussiana.

$$p = \frac{\ln\left(\frac{y_{grosseira} - y_{mediana}}{y_{mediana} - y_{fina}}\right)}{\ln(r_f)}, \quad (51)$$

em que,  $y$  é a variável monitorada em distintas malhas e  $r_f$  é a medida da diferença de espaçamento das malhas ( $r_f = N_{grosseira}/N_{mediana}$ ). Posteriormente, calculou-se uma malha teoricamente infinitamente fina (Equação 52).

$$y_{\infty} = y_{fina} + \frac{y_{fina} - y_{mediana}}{r_f^{p-1}}, \quad (52)$$

Após a etapa de extrapolação, o GCI foi calculado entre duas malhas,  $GCI_{12}$  considera a mudança da rede fina para mediana (Equação 53) e  $GCI_{23}$  da mediana para grosseira (Equação 54). Aplicou-se um fator de segurança,  $F_s = 1.25$ , para análises de três malhas diferentes (VAN HOECKE *et al.*, 2023).

$$GCI_{12} = \frac{F_s \left| \frac{y_{fina} - y_{mediana}}{y_{fina}} \right|}{r_f^{p-1}}, \quad (53)$$

$$GCI_{23} = \frac{F_s \left| \frac{y_{mediana} - y_{grosseira}}{y_{mediana}} \right|}{r_f^{p-1}}, \quad (54)$$

Verifica-se a resposta é aproximadamente igual a um para confirmar que as soluções estão no intervalo assintótico (Equação 55). Além disso, para verificar o intervalo do erro da malha ideal, utiliza-se a Equação 56.

$$r_f^p \frac{GCI_{12}}{GCI_{23}} \cong 1, \quad (55)$$

$$\left[ y_{fina} \left( 1 - \frac{GCI_{12}}{100\%} \right), y_{fina} \left( 1 + \frac{GCI_{12}}{100\%} \right) \right]. \quad (56)$$

No trabalho, o GCI foi empregado para verificar a quantidade de nós (tamanho da malha na discretização em volumes finitos da coluna) necessária para estabilização da solução, e escolha do melhor método de discretização da face. A quantidade de nós definida foi 100, maiores detalhes no Apêndice C.2.1.

Já o número de Courant ( $NC$ ) foi utilizado para evitar instabilidades numéricas, sendo comumente discutido na literatura (GOLSHAN-SHIRAZI; GUIOCHON, 1992; GUIOCHON *et al.*, 2006). A Equação 57 apresenta o cálculo do passo no tempo ( $\Delta t$ ) por meio do  $NC$  e o número de nós ( $Np$ ):

$$\Delta t_{max} = \frac{NC \Delta z}{u_L} = \frac{NC}{u_L} \left( \frac{L}{Np} \right); \quad (57)$$

em que  $u_L$  é a velocidade linear cromatográfica ( $u_s/\varepsilon_T$ ) e  $L$  é o comprimento da coluna. Assim,  $(L/Np)$  corresponde ao comprimento de um volume de controle, uma vez que a malha espacial era uniforme. O valor de  $NC$  utilizado foi 50, valores acima de 10 não possuem tanto impacto no quesito tempo de simulação (Apêndice C.2.1)

### 3.1.3. Modelo para o modificador da fase móvel

Para descrição e modelagem do gradiente, a concentração de modificador de fase móvel foi denominada  $\phi$  (modificador) no presente texto. Na prática experimental, pressupondo uma cromatografia com mistura de duas fases móveis, é comum que  $\phi$  assumira a proporção de injeção do solvente modificador, geralmente na proporção de solventes em v/v (volume/volume). Porém, a abordagem preferida no desenvolvimento da tese será adotar  $\phi$  como a concentração do modificador na fase móvel, em mg/mL.

Por hipótese, o modificador de fase não é adsorvido na fase sólida, portanto, assumindo um coeficiente de dispersão muito baixo, o termo de segunda ordem pode ser negligenciado na Equação 26 (ou na Equação 24) para o modificador de fase, o que simplifica a dinâmica da concentração do modificador para a Equação 58.

$$\frac{\partial \phi}{\partial t} = -u_L \frac{\partial \phi}{\partial z}, \quad (58)$$

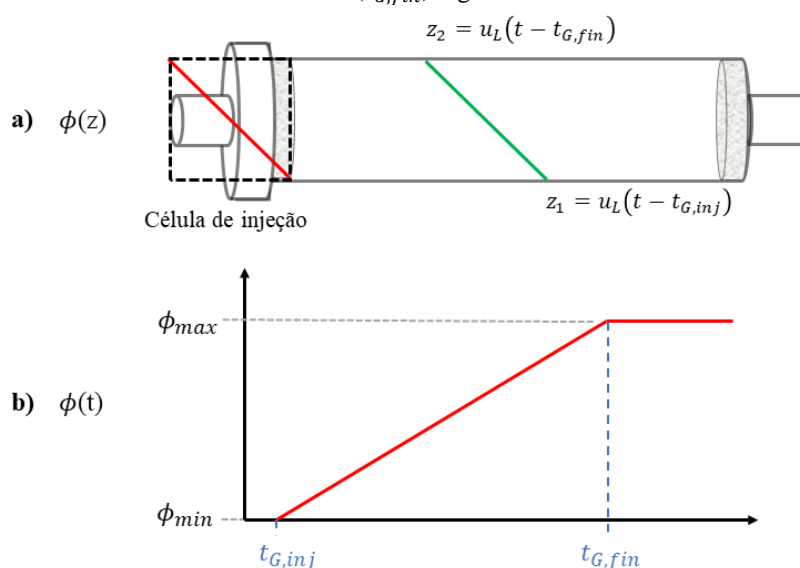
Na Figura 12, observamos que, antes do início da injeção do gradiente, toda a coluna está estabilizada em  $\phi = \phi_{min}$ . A distribuição na direção axial, indicada pela linha pontilhada da Figura 12a, representa  $\phi$  no momento inicial da entrada do gradiente linear na coluna. Este é momento em que o segmento de reta (rampa), que representa o gradiente, estaria “fora da coluna”. Esse instante foi denominado de tempo inicial de injeção,  $t_{G,inj}$ .

Em termos gerais,  $t_{G,inj} \geq 0$ , mas para operações mais comuns de cromatografia  $t_{G,inj} > 0$ , uma vez que existe uma etapa de carregamento e eluição que precede o

próprio gradiente. Assim, a composição da fase móvel na entrada da coluna ( $z = 0$ ) já não será mais a mesma ( $\phi \neq \phi_{min}$ ). A partir desse momento, a variação de  $\phi$  com o tempo,  $\left(\frac{\partial\phi}{\partial t}\right)_{z=0}$ , seguirá o gradiente linear. A Figura 12b representa  $\phi$  em função do tempo para na entrada da coluna ( $z = 0$ ), ou seja, corresponde à função de alimentação do modificador de fase.

A Figura 12a também apresenta a distribuição de  $\phi$  na direção axial para um instante de tempo posterior ( $t > t_{G,inj}$ ). Nesse caso, o tempo decorrido seria suficiente para que a secção  $z = 0$  da coluna já estivesse estabilizada no valor final de  $\phi$ , denominado  $\phi_{max}$ . A variação de  $\phi$  na secção de entrada da coluna ( $z = 0$ ) tem duração  $\Delta t_G$ , sendo que a passagem de  $\Delta t_G$  leva o valor de  $\phi$  em  $z=0$  de  $\phi_{min}$  a  $\phi_{max}$ . Assim, o tempo final do gradiente ( $t_{G,fin}$ ) pode ser definido como:  $t_{G,fin} = t_{G,inj} + \Delta t_G$  (conforme indica a Figura 12b).

**Figura 12** - Comportamento de um solvente, mistura de solventes ou sal dentro da coluna, (a) o perfil do modificador de fase que entra na coluna (vermelho e cercado em pontilhado), vai ser o mesmo na região interna à coluna (verde), porém deslocado no tempo. (b)  $\phi$  em função do tempo para secção de entrada da coluna; a concentração do modificador injetado na coluna depende do tempo que começa ( $t_{G,inj}$ ) e termina ( $t_{G,fin}$ ) o gradiente.



Em outras palavras, a mudança de  $\phi$  em posições internas à coluna será induzida pela advecção da fase modificadora no sistema a partir da mudança em  $\phi$  com o tempo

na entrada da coluna. Dado o tempo para advecção pela coluna, a distribuição espacial de  $\phi$  será sempre a mesma, mas deslocada no tempo, conforme indicou a Figura 12a.

Portanto,  $\phi$  permeia na coluna como um *front*, conforme descrito nas Equações 59, 60 e 61.  $\phi_{max}$  e  $\phi_{min}$  são as concentrações máxima e mínima do modificador (concentração do gradiente).  $z_1(t)$  é a posição da frente do modificador em um determinado momento. Para  $z$  maior que  $z_1$ , a coluna ainda não é afetada pelo gradiente.  $z_2(t)$  é a posição de  $\phi$  quando atinge  $\phi_{max}$ , permanecendo nessa concentração para qualquer  $z$  menor que  $z_2$ .

$$z \geq z_1 = u_L(t - t_{0,inj}) \rightarrow \phi = \phi_{min}, \quad (59)$$

$$z \leq z_2 = u_L(t - t_{f,inj}) \rightarrow \phi = \phi_{max}, \quad (60)$$

$$z_2 < z < z_1 \rightarrow \phi = \phi_{min} - \frac{1}{u_L} \left( \frac{\phi_{min} - \phi_{max}}{t_{f,inj} - t_{0,inj}} \right) (z_1 - z). \quad (61)$$

em que  $t_{0,inj}$  e  $t_{f,inj}$  são os tempos inicial e final de injeção do gradiente.

Definido do modo proposto, o gradiente linear do modificador avança da entrada da coluna começando em  $t_{G,inj}$  e alcança a saída da coluna em um tempo de traçador ( $t_T$ ), o que significa o tempo necessário para uma molécula sem retenção percorrer a coluna. Assim, após  $(t_{G,inj} + t_T)$ , a rampa terá iniciado sua saída da coluna. Como a injeção é contínua, o perfil se translada com uma velocidade  $u_L$  até o final da coluna, assim,  $\phi$  altera a cada tempo e secção da coluna. Portanto, em tempos menores que  $t_{G,inj}$  a concentração do modificador será  $\phi_{min}$  em todo  $z$  e maiores que  $t_{G,fin} + t_T$  será  $\phi_{max}$  em todo  $z$ . O apêndice B.2 traz a adimensionalização do modelo apresentado.

A solução do modelo dada pela Equação 58 foi utilizada para verificar a resposta do modelo analítico. As respostas se sobrepuseram, indicando que a solução analítica proposta é adequada para modelar a passagem do gradiente pela coluna dadas as hipóteses adotadas. Nesse aspecto, destaca-se o fato de que a dispersão axial do modificador foi desprezada. É importante também destacar que a solução numérica da Equação 58, ao tratar o modificador de fase como um componente do sistema, tornava o tempo computacional de simulação muito maior, impossibilitando a aplicação de algoritmos para ajuste de parâmetros. Isso ressalta a necessidade de aplicar solução analítica ao problema.

### 3.2. Plataforma de estimacão conjunta

Neste tpico, ensaios em coluna e em batelada são utilizados em conjunto para previsões de reteno de uma molécula modelo. Os materiais utilizados, detalhes dos procedimentos experimentais e da abordagem numérica.

#### 3.2.1. Materiais

A Soluo de Tergitol NP-40 (NP40) foi adquirida pela Sigma-Aldrich. Todos os outros produtos químicos utilizados foram de grau analítico. Todas as resinas de cromatografia empregadas eram sílica porosa fabricada pela Kopp Technologies com diferentes grupos funcionais. A PURIFICA-Y é caracterizada por um diâmetro de poro de 10-15 nm, com grupos funcionais de isobutil (ISO), 3 carbonos (C3), 1 carbono (C1), cianopropil (CN), fenil (PHE), diol (DIOL) e 18 carbonos encapsulados (PYC18EC). PURIFICA-X com um diâmetro médio de poro de 4 a 7 nm, funcionalizada com 18 carbonos encapsulados (PXC18EC). O tamanho de todas as partículas variou de 53 a 75 µm. Dentre essas resinas, a PURIFICA-Y C1 foi selecionada para ser empregada no experimento em coluna.

Os experimentos em microplacas foram conduzidos usando placas de filtro de 96 poços quadrados profundos, cada poço com um volume de 2,0 mL. As microplacas foram conectadas a um coletor de vácuo especial (Supelco) para extrair a fase líquida. No estágio de quantificao dos experimentos em batelada, um Multiskan SkyHigh da ThermoFisher foi aplicado para análise ultravioleta em uma microplaca de leitura (placa transparente UV de 96 poços).

Os ensaios de coluna foram realizados em um cromatógrafo Biotage® (modelo Selekt) em escala preparativa. A coluna flash foram empacotadas com sílica ativada porosa (Kopp Technologies®). As colunas utilizadas tinham uma altura média de 5 cm e um diâmetro de 1,25 cm.

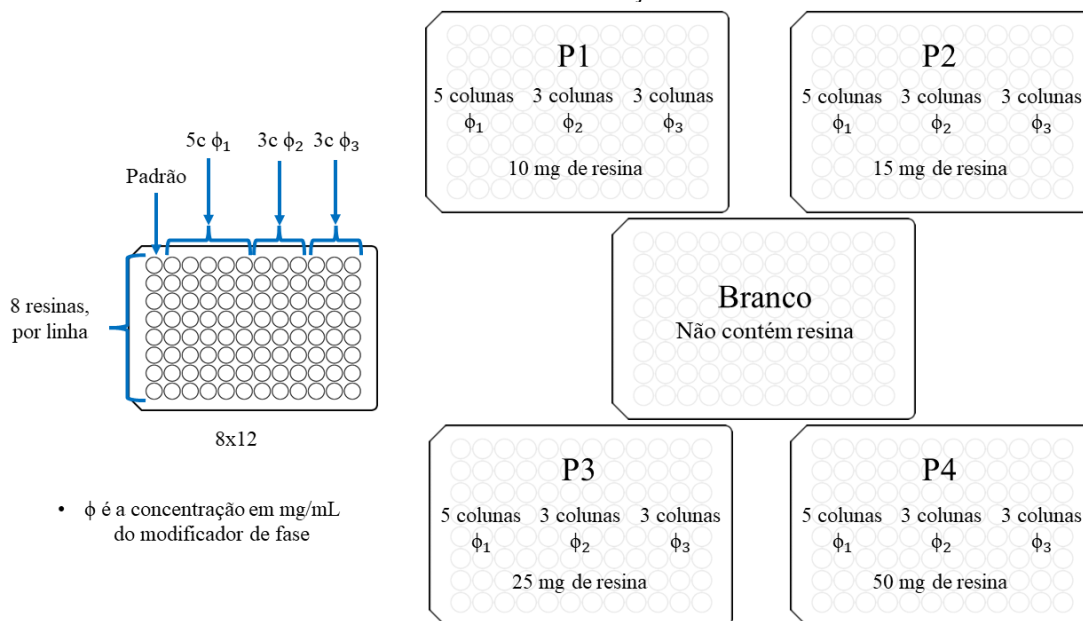
A soluço de fase líquida aplicada como fase móvel foi água desmineralizada tipo II contendo ácido fórmico 26,1 mM para os ensaios em coluna e em microplacas, e foi denominada "soluço tampão".

### 3.2.2. Procedimentos experimentais

#### 3.2.2.1. Experimentos em Microplacas

A concentração inicial do soluto ( $C_{L,0}$ ) e o volume da solução ( $V_L$ ) foram mantidos constantes, enquanto a massa da resina ( $M$ ) foi alterada. Os dados experimentais foram coletados utilizando cinco microplacas, cada uma contendo 96 poços, conforme mostrado na Figura 13.

**Figura 13** – Esquema experimental dos ensaios com placas de 96 poços para obtenção dos dados de isoterma de adsorção.



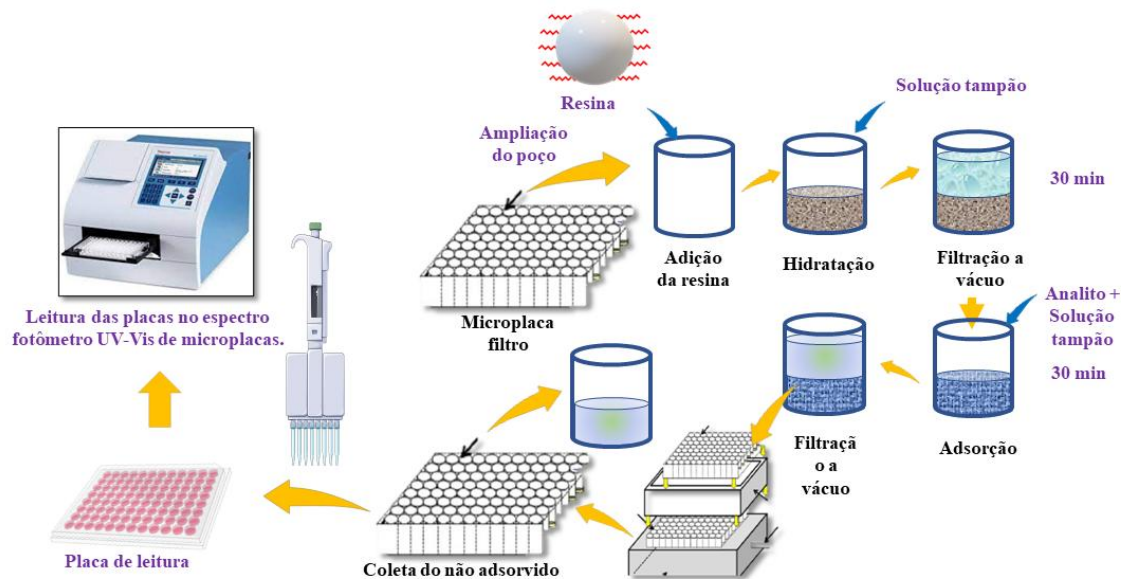
Uma das placas foi preenchida com soluções-tampão com diferentes concentrações de etanol ( $\phi_1$ ,  $\phi_2$ ,  $\phi_3$ ) (branco, na Figura 13). Nas outras placas, com exceção da primeira coluna, diferentes quantidades de resinas foram adicionadas aos poços: 10, 15, 25 e 50 mg, denominadas P1, P2, P3 e P4, respectivamente (Figura 13). Cada uma das 8 linhas totais corresponde a um tipo diferente de resina. Nenhuma resina foi adicionada à primeira coluna das placas, pois elas foram reservadas para a linha de base e os padrões, utilizados para avaliação da calibração do espectrofotômetro (escrito “padrão” na primeira coluna da Figura 13).

A Figura 14 ilustra passo a passo o procedimento experimental dos ensaios em microplacas. O material empregado como adsorvente apresentava baixa umidade nas condições de armazenamento. Assim, após a adição da massa desejada de resina em cada poço da placa, 1 mL de solução tampão com a concentração correspondente de etanol ( $\phi_1$ ,  $\phi_2$  e  $\phi_3$ ) foi adicionado para hidratar a resina. O processo de hidratação durou 30 minutos, após o qual a solução foi removida por um sistema de vácuo. Após a hidratação,

0,5 mL da solução tampão contendo 5 mg/L do componente-alvo e diferentes concentrações do modificador de fase foram adicionados aos poços.

As soluções nas placas foram mantidas em contato com as resinas cromatográficas por 30 minutos, antes de serem removidas pelo sistema de vácuo. Em seguida, uma alíquota de 0,37 mL do sobrenadante (a fase líquida do extrato) foi transferida para cada poço da microplaca de leitura. A placa de leitura possui um caminho óptico de 1 cm. As leituras de absorbância foram realizadas a 286 nm, em que 5 mg/mL de NP40 correspondiam a 1,256 unidades de absorbância.

**Figura 14** - Passo a passo do procedimento experimental de adsorção das microplacas.



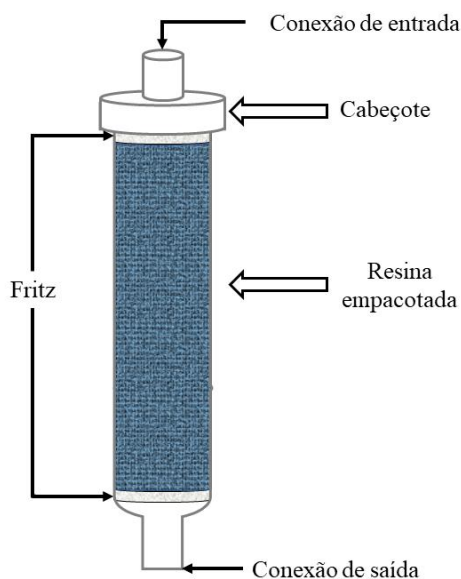
Na coluna “padrão” de cada placa, quatro poços foram preenchidos com a solução de referência (solução tampão), enquanto diferentes concentrações conhecidas foram adicionadas aos quatro poços restantes para verificar a curva de calibração. O modificador de fase foi ajustado de acordo com a Figura 13, e os  $\phi_1$ ,  $\phi_2$  e  $\phi_3$  representavam as concentrações de etanol de 0 mg/mL, 315,6 mg/mL e 631,2 mg/mL, respectivamente. Essas concentrações correspondem à proporção de etanol puro e solução tampão de 0%, 40% e 80% (v/v), respectivamente.

A concentração do sobrenadante obtida no experimento de microplaca foi submetida a um “teste Z” para detecção de valores discrepantes (*outliers*). E a reavaliação de outlier foi realizada após cada exclusão de um determinado ponto.

### 3.2.2.2. Experimento em coluna cromatográfica

A Figura 15 ilustra a coluna cromatográfica utilizada. Ela é composta por um espaço vazio entre a conexão com a tubulação do cromatógrafo até o fritz responsável pelo empacotamento da coluna, chamada de “cabeçote”. Vale ressaltar que esse espaço possui um volume de 1,5 mL, e foi preenchido com solução tampão. Antes da etapa de separação, ou seja, na injeção da amostra, esse espaço foi preenchido com a amostra a ser separada.

**Figura 15** - Desenho esquemático da coluna flash

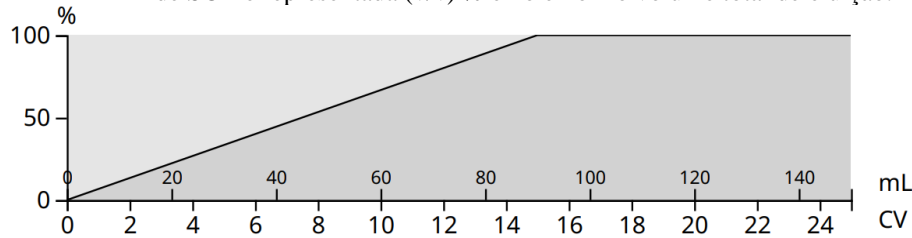


Durante o experimento em coluna, a coluna empacotada passou por um processo de lavagem e equilíbrio com a solução tampão. A lavagem foi realizada em duas etapas: a primeira com 30 mL de etanol (~5 C.V.) e a segunda com 30 mL de água tipo II. Ambas as soluções foram eluídas através da coluna a 12 mL/min (aproximadamente 2,5 min). Na etapa de condicionamento da coluna (equilíbrio), 30 mL da mesma solução de injeção da amostra foram bombeados através da coluna, na mesma vazão volumétrica.

Para o carregamento da amostra (molécula alvo), 1,5 mL de NP40 a 10 mg/mL em solução tampão foi adicionado ao topo da coluna. Em seguida, a coluna foi conectada ao cromatógrafo e 150 mL de fase móvel (volume de eluição, com ~25 C.V.) foram bombeados pela coluna. A vazão volumétrica do processo de cromatografia foi de 12 mL/min. A eluição foi iniciada com uma "solução tampão" imediatamente seguida por um gradiente linear de 0-100% (v/v) de uma solução modificadora (SM). A SM era composta de etanol a 789 mg/mL na solução tampão. O gradiente linear (Figura 16) levou cerca de 7,66 minutos (91,95 mL de volume acumulado, ou ~15 C.V.) e, em seguida,

apenas a SM foi alimentada até a eluição de 150 mL (12,5 minutos). Assim, a eluição total correspondia a ~25 C.V.

**Figura 16** - Eluição por gradiente do experimento com NP40. No eixo y, a variação da concentração de SOL é representada (v/v) % e no eixo x o volume total de eluição.



A porosidade do empacotamento ( $\epsilon_T$ ) foi determinada pela injeção de um traçador, que neste caso foi o sulfato de cobalto em uma concentração de 40 mg/mL. O  $\epsilon_T$  obtido para o PYC1 foi de 0,95. Os volumes morto e de retenção montante (seção 2.8) obtidos foram de 5,8 mL e 10,94 mL, respectivamente. As condições experimentais empregadas na simulação estão descritas na Tabela 2.

**Tabela 2-** Condições experimentais cromatográficas empregadas para simular a eluição do NP40.

Variáveis	Valores
$t_{0,inj}$ [min]	0
$t_{f,inj}$ [min]	7.66
$\phi_{min}$ [mg/mL]	0
$\phi_{max}$ [mg/mL]	789
$L$ [cm]	5
$r_c$ [cm]	0.625
$\epsilon_T$	0.95
$Q$ [mL/min]	12
$C_{feed}$ [mg/mL]	10
$V_{feed}$ [mL]	1.5

### 3.2.3. Modelos Matemáticos

O modelo escolhido para descrever a isoterma foi baseado no modelo de adsorção de Langmuir (Equação 3). Para descrever o efeito do modificador de fase na isoterma de adsorção, foi usado o modelo empírico baseado na Força Linear do Solvente (LSS), Equação 1. Portanto, O modelo de isoterma de adsorção que foi utilizado (Equação 62), combina Langmuir e o modelo LSS.

$$q = \frac{q_S b_0 e^{-S\phi} C_L}{1 + b_0 e^{-S\phi} C_L} \quad (62)$$

O Modelo Dispersivo de Equilíbrio (EDM/LSS, Equação 63) tem um dos menores conjuntos de parâmetros entre os modelos disponíveis e foi escolhido para descrever a operação da coluna. A Equação 63 pode ser melhor compreendida em B.1.5. e 2.6.3.

$$\frac{\partial C_L}{\partial t} + \frac{(1-\varepsilon_T)}{\varepsilon_T} \left[ \frac{\partial q}{\partial C_L} \frac{\partial C_L}{\partial t} + \frac{\partial q}{\partial \phi} \frac{\partial \phi}{\partial t} \right] = D_a \frac{\partial^2 C_L}{\partial z^2} - u_L \frac{\partial C_L}{\partial z} - F \frac{\partial q}{\partial \phi} \frac{\partial \phi}{\partial t} \quad (63)$$

As Equações 59, 60 e 61 foram utilizadas para incluir  $\phi(t, z)$  e reduzir o esforço computacional que seria necessário caso o modificador fosse incluído como componente no sistema. O sistema resultante de equações diferenciais parciais foi resolvido usando volumes finitos (seções 2.7, 3.1.1 e Apêndice B). O método de volumes finitos foi utilizado e o interpolador de face escolhido foi o Koren, como um compromisso entre precisão e esforço computacional (Apêndice C).

As equações diferenciais parciais foram discretizadas na posição da coluna, gerando um sistema de equações diferenciais ordinárias em função do tempo, que foi resolvido numericamente usando os métodos implícitos BDF (*Backward Differentiation Formulas*).

### 3.2.3.1. Estimação de parâmetros por experimentos em microplacas

Os parâmetros estimados pelos dados experimentais obtidos em microplacas foram a constante de saturação da resina ( $q_S$ ), constante de equilíbrio para ausência de modulador ( $b_0$ ) e constante ( $S$ ) de interação do modificador de fase ( $\phi$ ), fase estacionária e molécula. Portanto, o vetor de parâmetros foi definido como  $\underline{\theta} = [q_S \ b_0 \ S]^T$ . Os mínimos quadrados clássicos (MQC) foi utilizado para estimação dos parâmetros de ensaios em microplacas.

Nomeada de "abordagem dos q-residuais", o resíduo das concentrações adsorvidas experimentais ( $q_i^{exp}$ ) e do modelo (Equação 42) foi empregado para estimar  $\underline{\theta}$ . Neste caso,  $\mathbf{W} = \mathbf{I}$  na Equação 38. Com modelo LSS acoplado a isoterma de equilíbrio (Equação 62), a concentração no sólido do modelo ( $q_i^{mod}$ ) passa a ser definida pela Equação 64, melhor compreendida no Apêndice B.

$$q_i^{mod} = q_i^{mod}(q_s, b_0, S | C_{L,i}^{exp}, \phi_i^{exp}), \quad (64)$$

A concentração experimental em equilíbrio do soluto na fase líquida ( $C_L^{exp}$ ) foi obtida para diferentes quantidades de massa de resina ( $M$ ) e concentração de modificador ( $\phi$ ), explicado anteriormente pela Figura 13.  $V_S$  foi definido como a massa de resina vezes a fração sólida do esqueleto da coluna dividida pela densidade aparente da coluna, pois então, o emprego da porosidade do leito empacotado no cálculo de  $V_S$  se faz necessária, ( $V_S = M(1 - \varepsilon_T)/\rho_{app}$ ). O  $\rho_{app}$  foi de 0,45 g/mL para a resina C1. A concentração experimental na fase sólida ( $q^{exp}$ ) foi calculada diretamente pelo balanço de massa, Equação 41.  $V_L$  e  $C_{L,0}$  são variáveis contantes.

Uma abordagem melhor foi utilizada, chamada de "abordagem dos C-residuais". Nela o  $C_L^{exp}$  atua como variável dependente e  $V_S$ , além de  $\phi$ , como variáveis independentes. A abordagem de mínimos quadrados baseada no resíduo da concentração do líquido medido é definida pela Equação 47. O  $C_{L,i}^{mod}$  passa depender também de  $\phi$  (Equação 65) e o modelo é rescrito nas Equações 66 e 67 .

$$C_{L,i}^{mod} = C_{L,i}^{mod}(q_s, b_0, S | V_{S,i}^{exp}, \phi_i^{exp}), \quad (65)$$

$$C_L^{mod} = \frac{-\beta + \sqrt{\beta^2 + 4C_{L,0}b_0e^{-S\phi}}}{2b_0e^{-S\phi}}, \quad (66)$$

$$\beta = 1 + b_0e^{-S\phi}q_s \frac{V_S}{V_L} - b_0e^{-S\phi}C_{L,0}, \quad (67)$$

Em cada abordagem, a função custo apresentada na Equação 38 foi minimizada com a aplicação do algoritmo reflexivo da região de confiança (*Trust Region Reflective*, TRF). As duas abordagens são comparadas neste texto, sendo definida a melhor abordagem para o desenvolvimento de métodos cromatográficos.

### 3.2.3.2. Estimação de parâmetros por meio de um experimento em coluna

Para estimação paramétrica, foram utilizados o modelo equilíbrio dispersivo com modulador (EDM/LSS, Equação 63) em conjunto com o algoritmo de otimização utilizando dados de ensaios em colunas cromatográficas (seção 3.2.2.2). Todos os parâmetros do vetor  $\underline{\theta} = [D_a \ q_s \ b_0 \ S]^T$  foram estimados de um cromatograma experimental por meio da abordagem inversa. Nesse caso, o problema de otimização não linear foi resolvido por MQC e MQP (seção 2.8.3).

Para o método clássico (MQC), a função erro utilizada foi a Equação 48, sendo  $\mathbf{W} = \mathbf{I}$ . Para esse problema,  $D_a$  (Equação 28) foi calculado pela forma geométrica do pico em um cromatograma experimental (Figura 6 e Equação 27). Sendo uma forma de estimação, o  $D_a$  calculado foi utilizado como chute inicial do método de otimização da função perda. O chute inicial dos parâmetros  $q_s$ ,  $b_0$  e  $S$  foram os valores encontrados na estimação da isoterma de equilíbrio utilizando os dados de microplaca, pela “abordagem C-residuais”.

Para o método ponderado (MQP), a função erro utilizada foi a Equação 49, sendo a Equação 50 como matriz  $\mathbf{W}$ . A matriz de peso para o ruído do cromatograma foi considerada como a matriz de identidade dividida por um escalar,  $\mathbf{W}_1 = \mathbf{I}/\sigma^2$ .

Duas abordagens foram usadas para definir um valor para  $\sigma^2$ . Como apenas um pico experimental foi obtido para cada condição e molécula, uma curva gaussiana (modelo de definido na Equação 68) foi ajustada ao cromatograma e  $\sigma^2$  foi obtida como a variação do resíduo entre uma gaussiana (Figura 6) e o pico experimental ( $\underline{e} = \underline{y} - \underline{y}_{gauss}$ ).

$$y_{gauss,i} = \text{Área} / \sqrt{2\pi(w_b/2)^2} e^{-0,5\left(\frac{t_i - t_R}{w_b/2}\right)^2}, \quad (68)$$

Na Equação 68,  $w_b$ ,  $t_i$  e  $t_R$  são definidos como a largura da base do pico, tempo de eluição para cada ponto discreto  $i$  e tempo de retenção da molécula na coluna. A parte explicativa está na Figura 6 da seção 2.5). A Área corresponde à área total do pico, basicamente a massa injetada na coluna, para substâncias puras.

A segunda abordagem foi selecionar  $\sigma^2$  usando o método da curva L (L-curve). A curva L é comumente aplicada para determinar o parâmetro de ajuste na regularização de Tikhonov (CALVETTI *et al.*, 2000; TANG *et al.*, 2023). O parâmetro ideal para a regularização aparece no canto da curva L, que é chamado de canto global (TANG *et al.*, 2023).

A matriz de covariância (Equação 39) foi inferida a partir do ajuste utilizando os experimentos em batelada. A matriz  $\mathbf{W}_2$  foi então considerada como inverso dessa matriz de covariância. Os elementos da linha e da coluna de  $\mathbf{W}_2$  relacionados a  $D_a$  foram zero, pois, esse parâmetro não foi ajustado nos experimentos com microplacas. O chute inicial de  $D_a$  foi o mesmo utilizado em MQC.

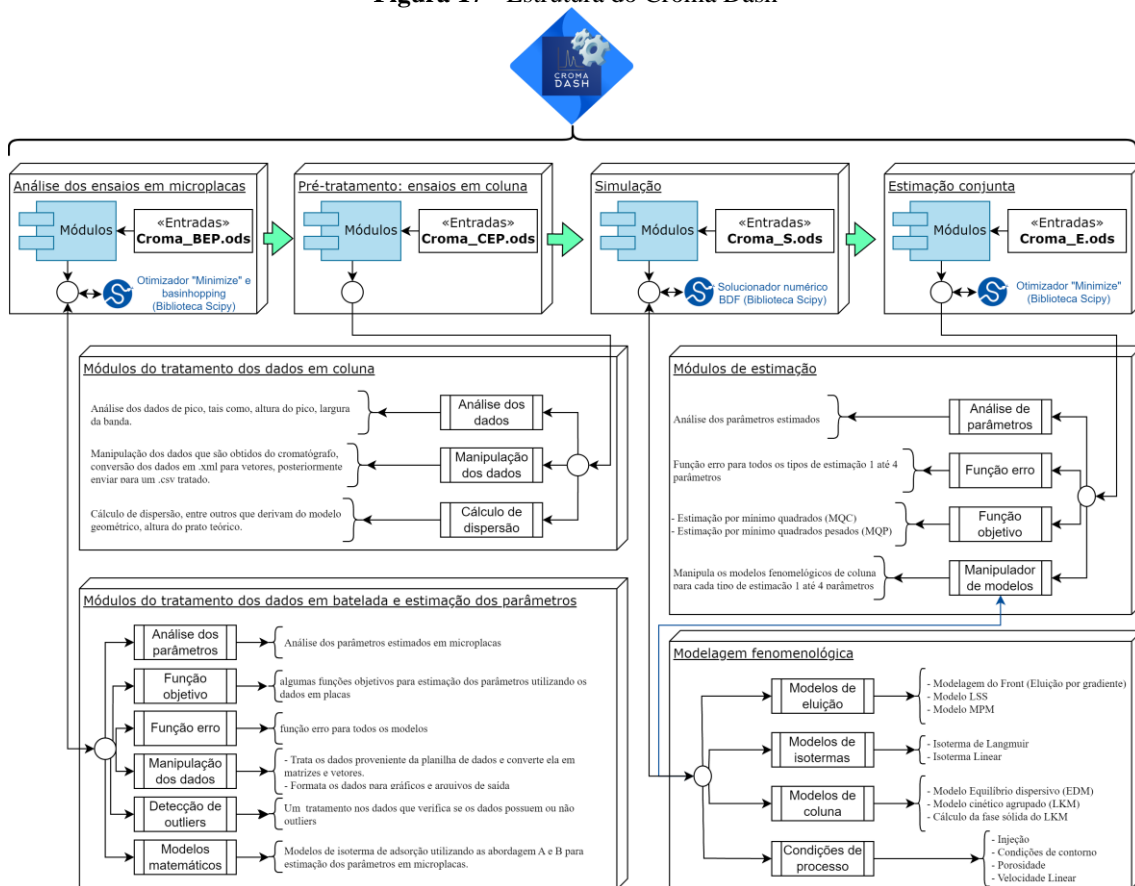
## 4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 4.1. Croma Dash: O software desenvolvido para simulação e estimação de parâmetros cromatográficos

O Croma Dash é uma ferramenta de tomada de decisão, para o desenvolvimento de métodos cromatográficos e foi registada no INPI (Instituto Nacional de Propriedade Intelectual, processo BR512022000420-8) com o nome *Croma Dash Engine*. A Engine (Software) está dividida em quatro principais funcionalidades (Figura 17) e seus respectivos nomes em parênteses:

- estimação dos parâmetros de isoterma dos ensaios em batelada (CromaD\_BEP),
- tratamento dos dados experimentais em colunas cromatográficas (CromaD\_CEP),
- simulador de colunas cromatográficas (CromaD\_S),
- estimador de parâmetros cromatográficos por meio de ensaios em colunas (CromaD\_E).

Figura 17 - Estrutura do Croma Dash



#### 4.1.1. Tratamento dos dados em batelada e estimação dos parâmetros (CromaD\_BEP)

Com o CromaD\_BEP, parâmetros de isoterma de equilíbrio são estimados a partir dos dados dos ensaios em batelada em esquema de placas apresentado na Figura 13. Atualmente, as isotermas implementadas no CromaD\_BEP são Langmuir (Equação 3) e linear (Equação 139), ambas com o acréscimo do modelo para o modulador de fase (Equação 4). As principais variáveis de entrada são:

- a concentração do componente em solução líquida não adsorvida ( $C_{L,i}^{exp}$ );
- modulador de fase ( $\phi$  e as respectivas frações, como exemplo,  $\phi_1, \phi_2, \phi_3$ );
- concentração inicial do componente ( $C_{L,0}$ );
- porosidade de um leito empacotado ( $\varepsilon_T$ );
- o volume da fase líquida do sistema ( $V_L$ );
- e as diferentes massas da resina empregada no experimento ( $M$ ).

Todos os dados de entrada foram adicionados em quatro planilhas, com a mesma organização matricial das microplacas, apresentada na Figura 13. Portanto,  $C_{L,i}^{exp}$  era uma matriz 8x12. A matriz concentração para cada tipo de material sólido foi manipulada, como foi obtido quatro  $M$  e três  $\phi$  distintos, a matriz para cada resina passou a ser 4x3.

O volume da fase sólida foi calculado pela densidade aparente da resina, algumas resinas da *Kopp Technologies* já possuem as respectivas densidades implementadas. A abordagem do CromaD\_BEP foi desenvolvida para que, por critérios estatísticos (Teste Z), *outliers* sejam retirados dos dados antes da estimação dos parâmetros.

Entre as respostas obtidas com o módulo, as principais foram:

- Parâmetros estimados [ $q_S$   $b_0$   $S$ ];
- Matriz de correlação (MC), Equações 69 e 70;
- Matriz de covariância de parâmetros estimada a partir do ajuste dos dados de microplaca ( $W_2$ ), Equação 71;
- Outros resultados a análise dos parâmetros estimados;

#### 4.1.2. Tratamento dos dados em coluna (CromaD\_CEP)

O CromaD\_CEP manipula os dados do cromatógrafo disponibilizado em um arquivo .xml, retira o volume morto e transforma em um arquivo de planilhas (.csv ou .xlsx), que é necessário para o funcionamento do CromaD\_E. Portanto, as principais variáveis de entrada são:

- Arquivo .xml do cromatógrafo da Biotage® (modelo Selekt) contendo o(s) picos cromatográficos;
- Porosidade da coluna ( $\varepsilon_T$ );
- Volume total da coluna;
- Volume morto do equipamento;

Os dados de absorvância ( $A_u$ ) e volume de fase móvel (mL) obtidos foram utilizados para calcular a variância entre o ponto experimental e um modelo gaussiano (Equação 68). A altura destes pratos e a dispersão aparente da molécula foram calculadas por meio da Equação 28. O volume de retenção do composto foi calculado como o ponto no eixo x em que y é considerado mais alto, ou seja, o topo pico cromatográfico, maior Absorvância.

#### 4.1.3. Simulador de coluna e seus modelos fenomenológicos implementados (CromaD\_S)

O CromaD\_S é responsável pela simulação das colunas cromatográfica. Os modelos fenomenológicos implementados foram EDM (seções 2.6.3, B.1.4 e B.1.5) e LKM (seções 2.6.4, B.1.2 e B.1.3), ambos os modelos foram modelados para um e múltiplos componentes. Neste trabalho, do LKM, o modelo de reação dispersiva foi implementado, dando enfoque a contribuição cinética de adsorção, devido a um delineamento experimental mais alinhado com a proposta de obtenção de parâmetros de adsorção. Os modelos implementados para prever a interação da molécula com a fase móvel (Eluições isocráticas e por gradiente) foram o LSS, MPM e o SMA. As isotermas de equilíbrio empregadas foram a Linear, Langmuir e a Langmuir múltiplos componentes. Todas Equações dos modelos estão no Apêndice B.

O CromaD\_S.ods é um arquivo de entrada dos dados. As principais variáveis de configuração são:

- Número de pontos de malha discretos (Volumes Finitos);

- Número de pontos em tempo/volume;
- A condição de convergência de Courant–Friedrichs–Lewy é importante para limitar o passo máximo no tempo (solucionador numérico);
- Seleção do interpolador numérico da discretização na posição da coluna (*Upwind*, *kappa*, *Koren*, *Minmod* ou *Superbee*);
- Condição de contorno da entrada e saída da coluna (Retangular ou Danckwerts);
- Volume de início do processo [mL] e Volume de término do processo [mL];
- Número de componentes do sistema;
- Tipo de modelo de adsorção (isoterma linear, isoterma de Langmuir ou modelo cinético de Langmuir Multicomponente);
- Taxa de fluxo da fase móvel [cm<sup>3</sup>/min] = [mL/min];
- Comprimento da coluna [cm], o diâmetro da coluna [cm] e o volume total do leito;
- Porosidade da coluna ( $\varepsilon_T$ );
- Concentração da molécula alvo na solução de injeção [mg/mL];
- Parâmetros do modelo equilíbrio dispersivo, EDM [ $D_a$   $q_S$   $b_0$   $S$ ];
- Parâmetros do modelo cinético agrupado, LKM-MPM [ $D_L$   $q_S$   $k_{a0}$   $k_{d0}$   $\beta$   $\gamma$ ];
- Parâmetros do modelo cinético agrupado, LKM-SMA [ $D_L$   $k_a$   $k_d$   $v$   $\sigma$ ];

A principais saídas são arquivos .csv com a matriz resposta, concentrações em todos os tempos e espaços na coluna (número de pontos em volume versus número de pontos de malha discretos), o vetor concentração no tempo ou volume de eluição e os gráficos com os resultados.

#### 4.1.4. Estimação conjunta ou clássica (CromaD\_E)

No CromaD\_E é possível estimar os parâmetros aplicando mínimos quadrados clássico (MQC) e pesados (MQP). A estimação de parâmetros foi implementada somente para único componente. O MQP utiliza apenas o modelo EDM, já para MQC implementou-se também o modelo LKM com os parâmetros do MPM. No modulo de estimação somente as variáveis de configuração alteram, e elas são:

- Tipos de configuração de estimação de parâmetros;
  - um parâmetro (1P) - [ $D_a$ ] -- EDM - MQC,
  - parâmetros de coluna [ $D_a$   $\varepsilon_T$ ] -- EDM - MQC,
  - dois parâmetros (2P) - [ $b_0$   $S$ ] -- EDM - MQC,
  - três parâmetros (3P) - [ $q_S$   $b_0$   $S$ ] -- EDM - MQC,

- quatro parâmetros (4P) -  $[D_a q_S b_0 S]$  -- EDM - MQC,
  - parâmetros de adsorção (3P-MQP) -  $[q_S b_0 S]$  baseada em estimativa conjunta com os parâmetros experimentais obtidos em batelada sem ajustar  $D_a$  -- EDM - MQP,
  - todos os parâmetros (4P-MQP) =  $[D_a q_S b_0 S]$  baseada em estimativa conjunta com os parâmetros experimentais obtidos em batelada ajustando também  $D_a$  -- EDM - MQP,
  - dois parâmetros cinéticos -  $[D_L k_{a0}]$  -- LKM - MQC,
  - seis parâmetros cinéticos -  $[D_L q_S k_{a0} k_{d0} \beta \gamma]$  -- LKM - MQC.
- Matriz covariância inferida da resposta dos experimentos em batelada (resposta do CromaD\_BEP)
  - Parâmetros estimados utilizando os experimentos em batelada (resposta do CromaD\_BEP)

#### 4.2. Análise dos solucionadores numéricos implementados (Simuladores)

Neste tópico, foram realizados estudos da velocidade e precisão dos solucionadores numéricos. Os parâmetros da Tabela 3 foram aplicados em sucessivas simulações, cujos resultados gerais foram apresentados aqui com o objetivo de avaliar distintos códigos de solução de EDO's (solução no tempo).

O conjunto de equações diferenciais ordinárias obtidas após discretização no espaço (“Apêndice B.1.5.”) foram resolvidas no tempo pelos métodos implícitos BDF e Radau, e os explícitos RK45 e DOP853. Neste caso, a isoterma aplicada foi a linear, a injeção foi do tipo pulso retangular tratada como função prescrita nas Equações 34, 35 e 36, a eluição foi por gradiente linear, o número de nós do volume finito foi de 100 e o *kappa* como esquema de face. Em termos dos parâmetros de modelo, foram utilizados valores anteriormente relatados. As tolerâncias relativas (*rtol*) e absolutas (*atol*) aplicadas no integrador foram  $1,0 \times 10^{-5}$  e  $1,0 \times 10^{-10}$ , respectivamente. As precisões dos solucionadores utilizando distintos métodos de integração foram comparadas na Figura 18, em que a legenda traz também o tempo necessário para obter a solução numérica.

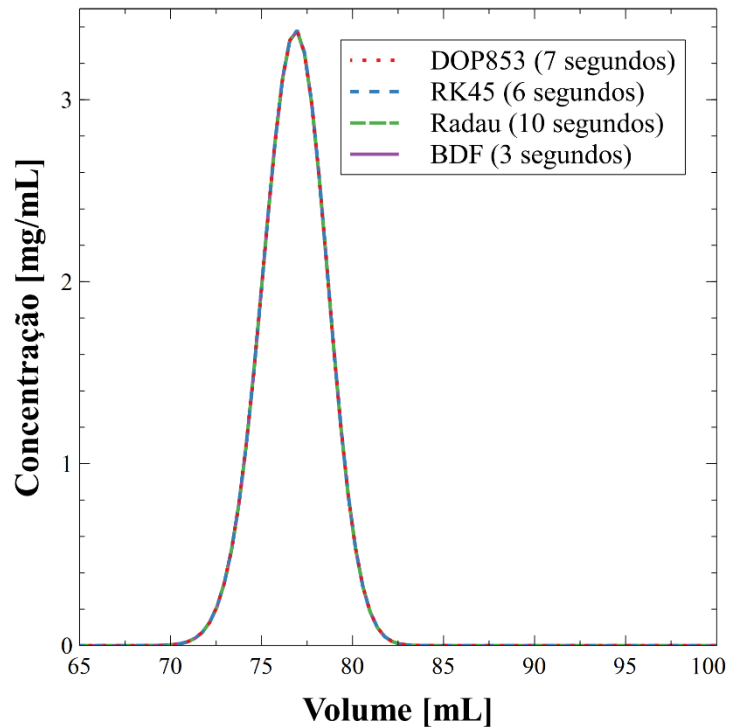
A simulação pelo método implícito BDF apresentou o melhor tempo de simulação em relação aos demais. Entretanto, o método Radau foi o que apresentou solução mais lenta, assim, não é possível afirmar que o melhor desempenho do BDF seja somente

devido a qualquer rigidez associada ao problema, uma vez que o Radau também é indicado para problemas rígidos.

**Tabela 3** - Valores das variáveis utilizadas para as simulações de estabilidade numérica

Variável	Valor
$t_{0,inj}$	0 mL
$t_{f,inj}$	7,66 mL
$\phi_{min}$	0 mg/mL
$\phi_{max}$	789 mg/mL
$L$	5 cm
$r_c$	0,625 cm
$\varepsilon_T$	0,95
$q_s$	2105 mg/mL
$Q$	12 mL/min
$C_{feed}$	10 mg/mL
$V_{feed}$	1,5 mL
$D_a$	0,2 cm <sup>2</sup> /min
$b_0$	0,868 mL/mg
$S$	0,00678 mL/mg

**Figura 18** – Resposta numérica de cromatograma para a concentração de saída da coluna em função do volume acumulado de solvente com simulações utilizando distintos integradores (a legenda indica o tempo necessário para simular o sistema)



Todos os métodos ofereceram soluções sobrepostas (Figura 18), o que indica boa precisão de todos para a malha utilizada. A velocidade de resposta do BDF foi 3 segundos

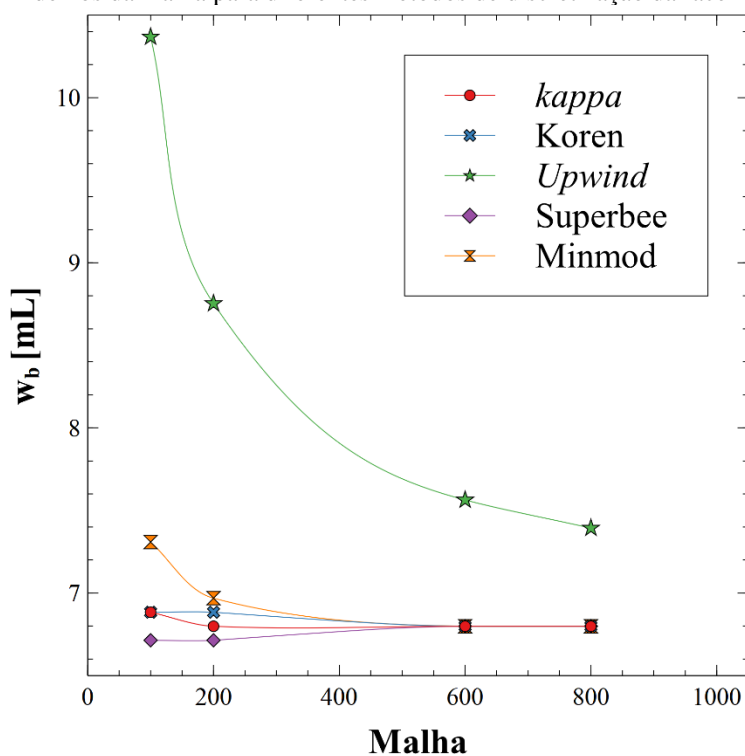
mais rápida do que o RK45. Então, a solução pelo método BDF foi mais ágil, sendo esse o método de integração escolhido para as outras aplicações.

#### 4.2.1. Escolha do melhor esquemas de face para EDM de um único componente

Normalmente, a velocidade e a precisão da solução numérica dependem também do esquema de interpolação para as funções nas faces dos volumes gerados pelo método dos volumes finitos. Os esquemas de face foram avaliados utilizando os valores das variáveis descritas na Tabela 3.

No quesito precisão numérica, o melhor esquema de face está interligado com outros fatores, tais como, o número de nós do volume finito e o passo variável do solucionador numérico,  $\Delta t$ . Conforme mencionado antes, a propriedade  $w_b$  de uma curva gaussiana (Figura 6) foi utilizada para analisar o melhor número de nós (malha). Neste caso, qualquer imprecisão numérica tende a mudar a largura na base do pico ( $w_b$ ). As condições da Figura 19 foram a isoterma de equilíbrio linear, eluição por gradiente e pulso retangular definido em função prescrita como condição de contorno.

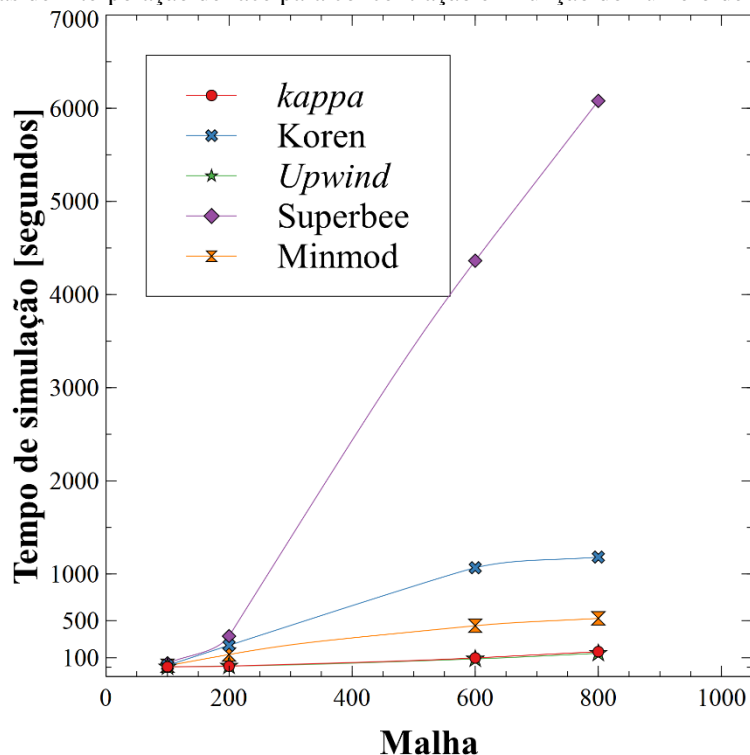
**Figura 19** - Variação da largura da base ( $w_b$ ) do pico ao final da coluna simulado em função do número de nós da malha para diferentes métodos de discretização da face



Em relação à precisão, os melhores limitadores nas condições testadas foram os de segunda ordem ou mais, já que o *Upwind* com número de nós igual a 800 ainda não tinha se estabilizado (Figura 19). O desempenho fraco do *Upwind* era esperado, uma vez que se trata de um método de primeira ordem, que deve utilizar malhas mais refinadas para apresentar desempenho similar aos demais. Neste caso, há uma importância nos modelos de interpolação das faces dos volumes finitos de alta ordem, pois fornecem alta precisão mesmo que com malhas de tamanho intermediário (aqui entre 200 e 600) e evitam a difusão numérica.

A Figura 20 apresenta o tempo de simulação em função do número de nós da malha para distintos esquemas de face, na qual observou que os mais rápidos eram o Minmod, *kappa* e *Upwind*. Entretanto, pela Figura 19, o Minmod e *Upwind* precisaram de mais nós para estabilizar, enquanto o *kappa* e Koren possuíam valores de  $w_b$  bem próximos do estabilizado já com 100 nós (Tabela 4). É importante ressaltar que o tempo de simulação de todos os métodos de interpolação da face foram inferiores a 20 segundos para 100 nós de malha, exceto o Superbee que demorava 42 segundos.

**Figura 20** – Tempo que leva para obter a resposta simulada dos solucionadores com distintos esquemas de interpolação de face para concentração em função do número de nós da malha.



Para conferir a melhor precisão, o índice de convergência da malha (GCI) baseado na largura de pico foi calculado (Tabela 4) para os melhores resultados da Figura 19 e Figura 20. Porém, o solucionador utilizando o interpolador *kappa* já se estabilizou na

malha 200 e não foi possível o cálculo de GCI de 3 malhas distintas, pois na malha de 200 o erro foi igual a zero devido a precisão da máquina. Ou seja, o interpolador *kappa* para malha 100 já estaria dentro da resposta de uma malha infinitamente fina ( $w_{b\infty} = 6,892$  mL, Equação 52) com o cálculo de duas malhas, sendo 100 a mediana e 200 a fina. Já para o interpolador Koren, a resposta de uma malha finita ( $w_{b\infty} = 6,884$  mL) também possibilita utilizar a malha de 100 nós.

**Tabela 4** - GCI calculado para dois limitadores de fluxo diferentes, *kappa* e Koren.

Limitador de fluxo	$w_b$ [mL] malha =100	$w_b$ [mL] malha =200	$w_b$ [mL] malha =600	$w_{b\infty}$
Koren	6,884	6,884	6,799	6,884
kappa	6,884	6,799	6,799	6,892

No simulador, o número de Courant (*NC*) foi utilizado para estipular um valor de  $\Delta t$  máximo (Equação 57) para o solucionador numérico das EDOs. Sob as condições da Tabela 3, o *NC* extrapola o valor de 1, apresentando  $NC = 50$ . Como o solucionador pode alterar o passo de integração (passo variável), o  $\Delta t$  máximo calculado da Equação 57 era entrada dos integradores numéricos, o que limita o passo máximo a ser utilizado. Utilizando o limitador com base no número de Courant, espera-se resguardar a estabilidade numérica, mesmo variando-se a malha espacial.

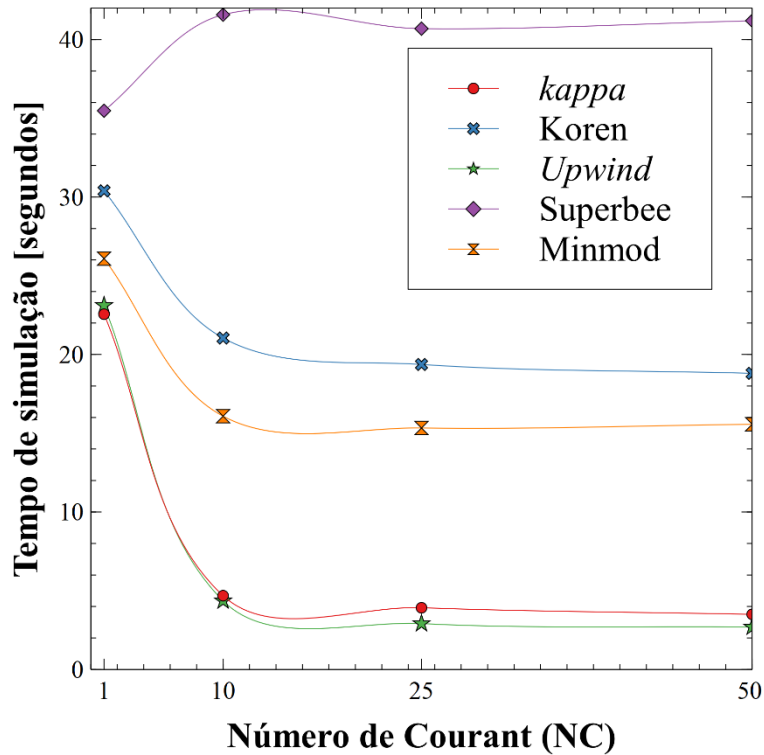
Na Figura 21, é possível observar o efeito que a variação do *NC* na Equação 57 tinha no tempo computacional dos solucionadores para cada interpolador testado. Neste caso, utilizou-se a isoterma de equilíbrio Linear, eluição por gradiente, pulso retangular como função prescrita na condição de contorno e os números de nós foram 100. Para  $NC > 25$  o tempo de simulação não é afetado.

Como esperado, o número de nós na malha e consequentemente  $\Delta t_{max}$  afetam a velocidade de simulação (Figura 21). O simulador foi construído para reduzir o passo máximo do solucionador de EDOs, reduzindo o número de Courant ou aumentando o número de nós dos volumes finitos (*Np*), porém, reduzir o  $\Delta t$  máximo implica também em um maior tempo computacional.

Em resumo, os métodos de interpolação da face que apresentaram os melhores resultados foram o de segunda ordem, *kappa*, e o de terceira ordem, Koren. Para os demais métodos, foram necessárias malhas mais refinadas para que a solução se estabilizasse. No método TVD, os limitadores de fluxos analisados foram Koren, Minmod e Superbee, no qual o último necessitou de números de nós maiores que 200 para estabilizar a solução

numérica. Sendo assim, o limitador Superbee foi o mais lento, sendo de 29 segundos para simulação com um número de nós igual a 100. O tempo de simulação para o limitador Minmod com malha mais refinada excedeu os 20 segundos do Koren, apesar do Minmod para número de nós igual a 100 ter sido mais ágil que o próprio Koren.

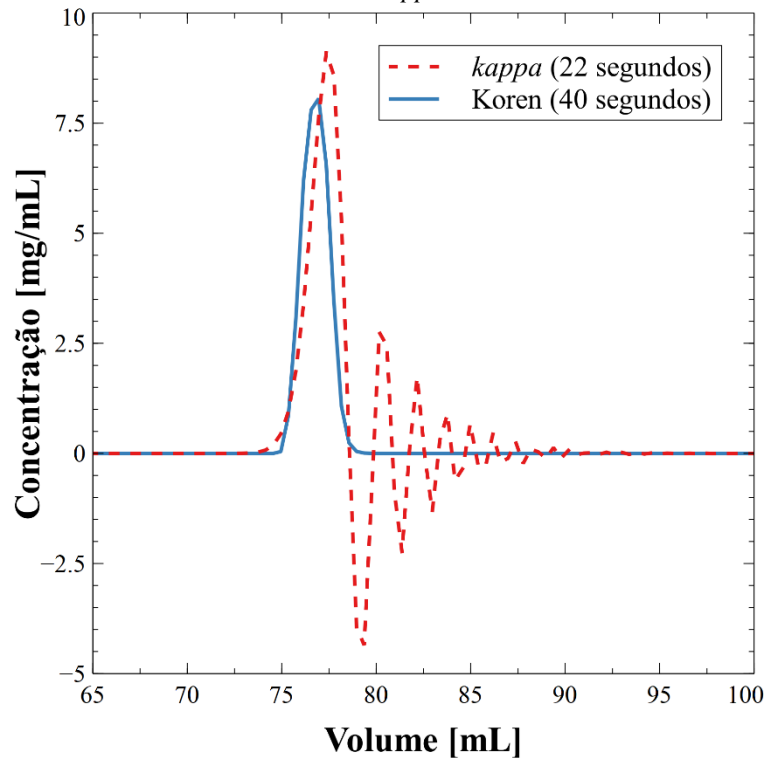
**Figura 21** – O tempo de simulação alterando o  $NC$  ( $\Delta t_{max}$ ) para distintos esquemas de interpolação de face



Apesar do *kappa* apresentar melhores resultados, para dispersão aparente baixa ( $D_a < 0,1$ ) a discretização da face apresentou muita oscilação. Para exemplificar (Figura 22), foram simulados dois cromatogramas com os parâmetros da Tabela 3, mas alterando-se a dispersão axial (antes de  $0,2 \text{ cm}^2/\text{min}$ ) para  $D_a = 0,01$ , tanto para discretização da face *kappa* quanto Koren. Neste caso, foi possível observar que o tempo de simulação também aumentou (aproximadamente 20 segundos) ao reduzir a dispersão aparente.

O método *Upwind* demora a estabilizar com o aumento do número de nós da malha, na maioria dos casos é necessária uma malha mais refinada que 800 nós, como demonstra a Figura 19. Dentre os limitadores de fluxo do método TVD da Tabela 1, o Koren é o que estabiliza mais rápido com uma malha mais grosseira.

**Figura 22** - Influência da dispersão aparente ( $D_a = 0,01\text{cm}^2/\text{min}$ ) na discretização da face Koren e  $kappa$

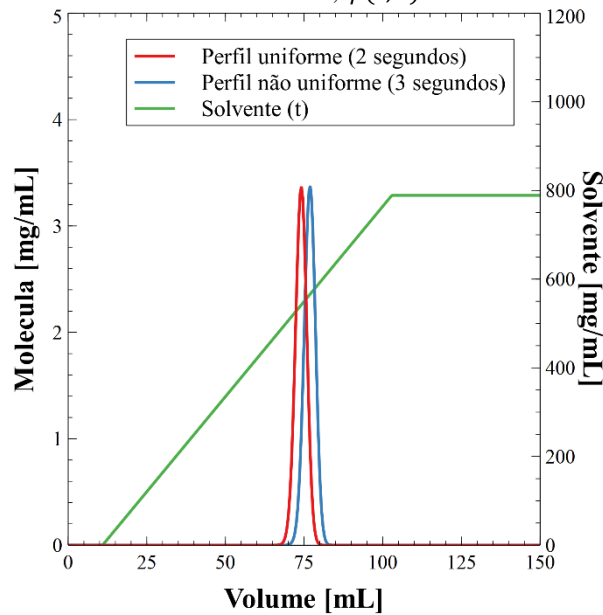


Koren e  $kappa$  foram os dois métodos em destaque para os testes realizados, um devido ao compromisso robustez-velocidade e outro devido somente à velocidade, ou seja, por conta do tempo computacional reduzido. O método de interpolação dos volumes finitos com Koren foi o que obteve maior precisão, mas para simulações em que não havia oscilações o  $kappa$  foi muito mais rápido e com precisão adequada. Os problemas de oscilação com o  $kappa$  surgiram para dispersões axiais mais baixas e tornaram a resposta menos confiável, porém, é fácil notar os problemas de estabilidade quando os mesmos estão presentes.

#### 4.2.2. Influência da modelagem da concentração do solvente na coluna

Neste tópico, a isoterma de Langmuir, condição de contorno pulso retangular e o interpolador de face  $kappa$  foi utilizado. A influência da resposta do simulador com concentração do solvente na coluna foi analisada na Figura 23.

**Figura 23** - Influência da modelagem do solvente na coluna, linha vermelha corresponde a concentração uniforme (constante) na coluna,  $\phi(t)$ , e linha azul para concentração variável ao longo da coluna,  $\phi(t, z)$ .

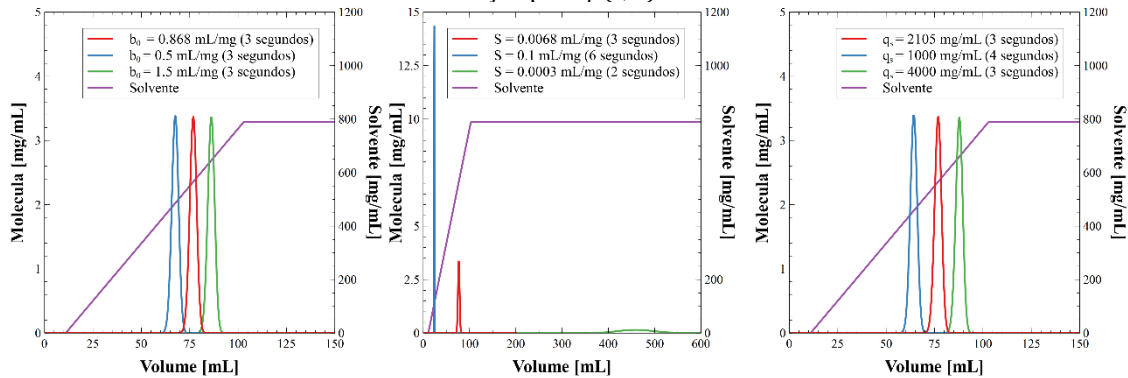


A concentração do modificador constante  $\phi(t)$  ao longo da coluna possui um tempo de retenção menor (linha vermelha) que o perfil não uniforme, ou seja, concentração de solvente variável ao longo da coluna  $\phi(t, z)$ .

Ao modelar a concentração do modificador como função da posição na coluna observou-se um volume de retenção maior comparado aos resultados utilizando um mesmo valor para toda a coluna. De forma, menos evidente também houve um aumento na dispersão do pico ao calcular a concentração em função da posição, comportamento esperado.

A Figura 24, mostra o efeito de cada parâmetro de isoterma na resposta do cromatograma. Observa-se que o tempo de retenção é sensível às variações dos três parâmetros ( $b_0$ ,  $S$  e  $q_s$ ). Já a variação em  $S$  altera muito a altura do pico. Isso ocorre pela variação na dispersão do pico. O estreitamento do pico (e seu aumento) também mostrou levar a um aumento no tempo de simulação.

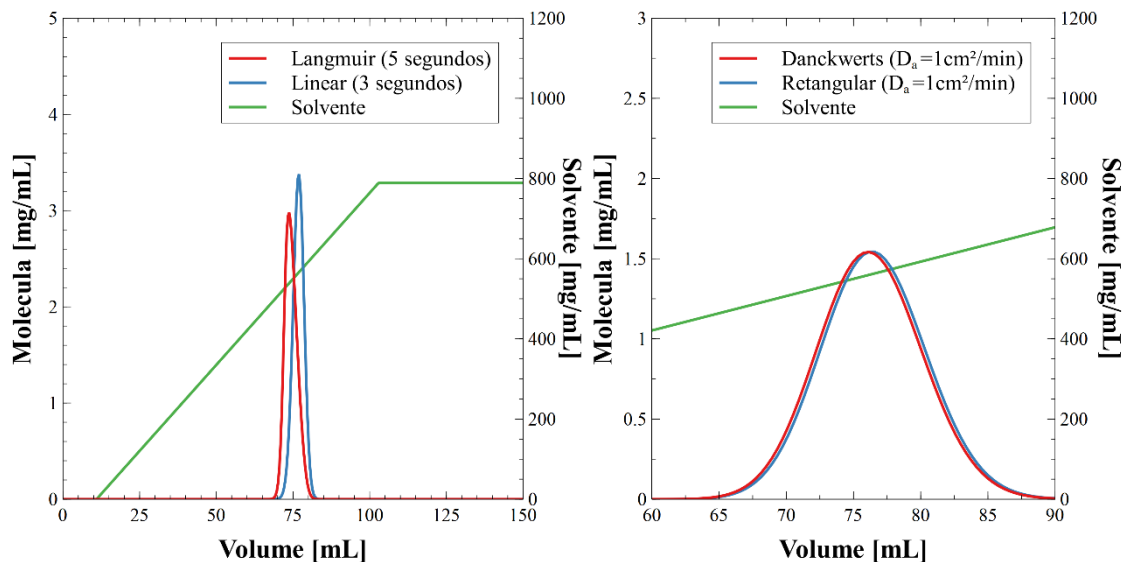
**Figura 24** – Efeitos dos parâmetros na altura do pico, no volume de retenção e no tempo de simulação para  $\phi(t, z)$  variável.



#### 4.2.3. Influência das isothermas de equilíbrio e da condição de contorno

O impacto no tempo computacional da simulação empregando a isoterma Langmuir foi relevante, tendo se apresentado com quase a metade da velocidade do simulador com isoterma linear em alguns dos testes desenvolvidos. Ou seja, a simulação segundo os parâmetros descritos levava cerca de 3 minutos para isoterma linear (malha com 100 nós,  $NC = 50$  e  $kappa$  como método de interpolação), enquanto a mesma simulação com Langmuir levava 5 minutos (Figura 25). A comparação das isothermas e da condição de contorno pode ser realizada utilizando a Figura 25.

**Figura 25** - Comparação da isoterma Langmuir e linear e a condições de contornos Pulso retangular e Danckwerts.



Para poder observar a alteração do pico com a variação da condição de contorno utilizada, foi preciso alterar o valor de  $D_a = 0,2$  cm<sup>2</sup>/min para  $D_a = 1$  cm<sup>2</sup>/min na

simulação da Figura 10. Efeitos da condição de contorno tende a atrasar o pico cromatográfico.

As melhores simulações cromatográficas puderam ser realizadas com 3 a 20 segundos de tempo computacional. Com uma simulação rápida é possível estimar parâmetros cromatográficos com tempo médio de 2 horas. A utilização do modelo equilíbrio-dispersivo permitiu a agilidade da simulação devido à sua simplicidade, o que é importante para aplicações de tomada de decisão e ajuste paramétrico.

O tempo computacional usando o *kappa* é muito menor que o Koren, o que é importante para uma ferramenta de tomada de decisão, principalmente para agilizar a estimação dos parâmetros. Porém, pode apresentar oscilações, ainda assim o método *kappa* pode ser muito útil em testes computacionais e nas etapas iniciais de ajuste paramétrico, devido à velocidade de simulação. O método Koren foi escolhido neste trabalho para validação da ferramenta de tomada de decisão.

#### 4.3. Dados das placas: seleção de resina e detecção de outliers

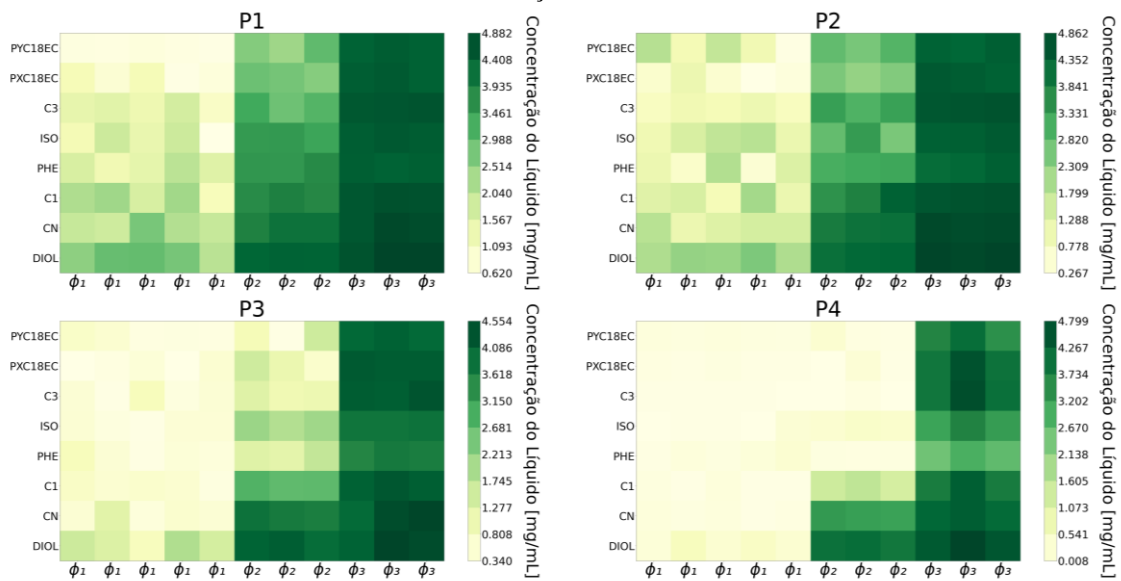
Os experimentos em batelada utilizando microplacas geraram dados para 8 resinas diferentes, variando a concentração do modificador ( $\phi_1 = 0$  mg/mL,  $\phi_2 = 315,6$  mg/mL,  $\phi_3 = 631,2$  mg/mL) e massa de resina (10, 15, 25, 50 mg) para cada resina. Os dados resultantes foram mapeados para todas as resinas testadas (Figura 26). As resinas são organizadas desde as mais hidrofóbicas (primeiras fileiras) até as menos hidrofóbicas (últimas fileiras).

A Figura 26 exhibe a concentração de NP40 na fase líquida. Como a mesma quantidade de NP40 foi adicionada a todos os poços, quanto mais escuro o poço, menor é a quantidade adsorvida. Com base neste valor, foi observada maior retenção para as resinas hidrofóbicas: PYC18EC, PXC18EC, C3, ISO e PHE. Isto pode ser melhor visualizado na quarta placa (P4) devido à sua maior quantidade de resina (50 mg). CN e DIOL apresentaram adsorção muito menor em comparação aos demais.

Em  $\phi_2$ , foi observada uma adsorção intermediária para C1 (sexta linha da Figura 26), melhor observada em P3 e P4. A resina C1 permitiu reter uma quantidade significativa do surfactante NP-40, o que é crucial para a obtenção de dados confiáveis na modelagem da eluição. Os resultados indicam que esta resina é uma candidata viável para fins de purificação da molécula alvo. Suas propriedades interativas podem favorecer

para uma melhor seletividade, uma vez que a molécula possui propriedades hidrofílicas e hidrofóbicas (Figura 27), e o solvente utilizado (etanol) é polar. Um adsorvente com forte capacidade de retenção na coluna cromatográfica leva a um tempo de eluição mais longo ou a um gradiente mais acentuado. Portanto, resinas com cadeia alquílica mais curta (C1-C3) podem ser um bom compromisso entre resolução e tempo de retenção. Portanto, a resina PYC1 foi escolhida para o processo de cromatografia.

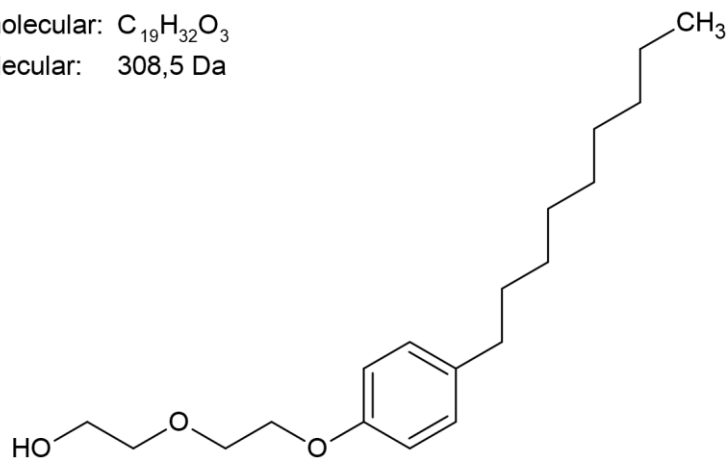
**Figura 26** - Concentração experimental no líquido ( $C_L^{exp}$ ) para placas P1 (10 mg), P2 (15 mg), P3 (25 mg) e P4 (50 mg) para solução NP40 com diferentes concentrações de etanol ( $\phi_1$ ,  $\phi_2$ ,  $\phi_3$ ) e todas as resinas. Cores mais próximas do branco indicam concentrações mais baixas e verdes escuras concentrações mais altas.



**Figura 27** – Estrutura molecular do 4-Nonilfenol dietoxilado (NP-40)

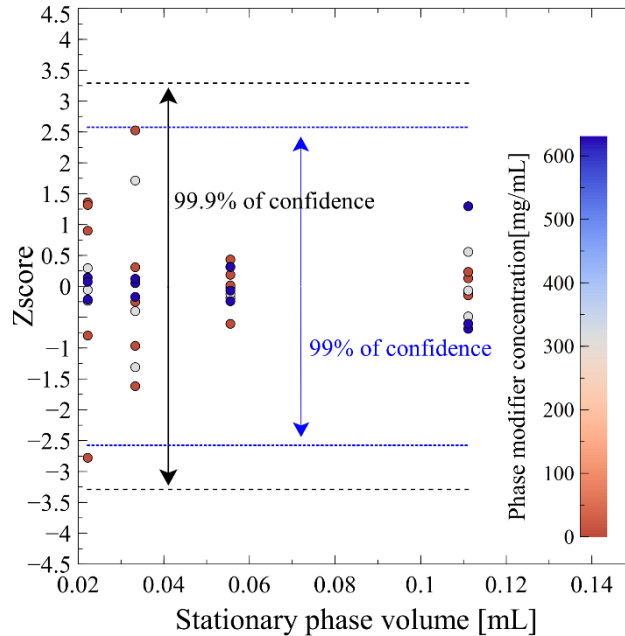
Fórmula molecular:  $C_{19}H_{32}O_3$

Massa molecular: 308,5 Da



Em termos de detecção de outliers (Figura 28), foi utilizado um escore z crítico para uma significância estatística de  $\alpha = 0,1\%$ . Por esta significância, nenhum dado foi excluído. Se fosse utilizada uma significância de  $\alpha = 1,0\%$ , apenas um ponto de dados seria removido.

**Figura 28** - Critérios de exclusão dos dados experimentais, supondo que os dados tenham uma distribuição normal.



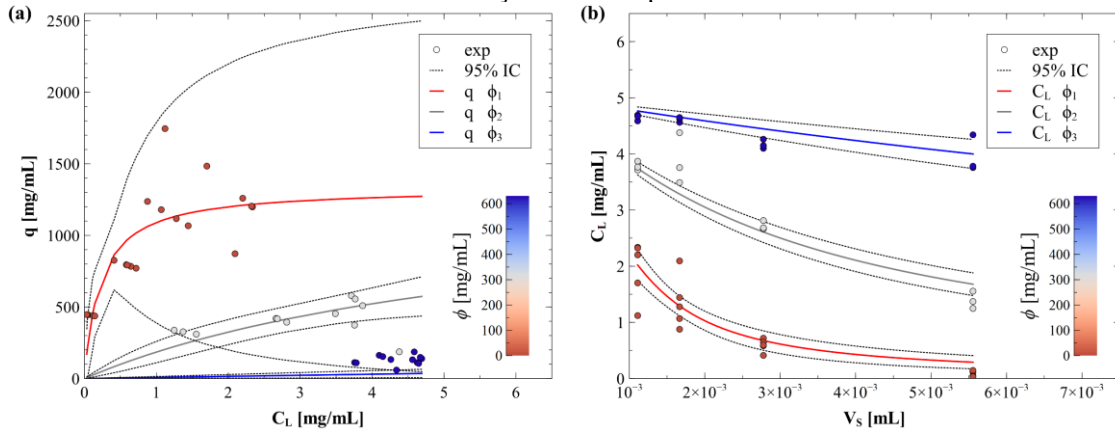
No caso em questão, deve-se também considerar que o nível de incerteza dos dados é alto devido ao número de procedimentos experimentais utilizados na sua obtenção, o que implica na preferência por um intervalo maior, desprivilegiando a remoção do dado como *outliers*. Assim, para a abordagem desenvolvida, a significância de  $\alpha = 0,1\%$  é recomendada por via de regra, com exceção dos casos em que os possíveis *outliers* afetam muito a estimação dos parâmetros do modelo (M. SCHWAAB AND J.C. PINTO, 2007).

#### 4.4. Estimação de parâmetros por meio de experimentos em microplacas

Neste tópico, as duas abordagens de estimação de parâmetros foram comparadas. A melhor abordagem foi escolhida e utilizada para as demais seções do texto.

Os resultados do ajuste para as abordagens q-residuais e C-residuais (Equações 42 e 47, respectivamente) podem ser vistos na Figura 29. A figura também mostra a inferência da incerteza do modelo.

**Figura 29** - Resultados de ajuste para a estimativa de parâmetros a partir de dados de microplacas. (a) e (b) mostram a previsão da isoterma de equilíbrio usando os parâmetros estimados com base nas abordagens dos q-residuais e C-residuais, respectivamente. As linhas pontilhadas correspondem ao intervalo de confiança de 95% da previsão do modelo.



Embora visualmente a abordagem dos q-residuais (Figura 29a) represente bem os dados experimentais para valores de  $\phi_1 = 0 \text{ mg/mL}$ , o grande intervalo de confiança de 95% é perceptível. Esse intervalo indica a confiança do modelo obtida pela propagação de erros a partir da covariância de parâmetros. A forma dispersa dos pontos experimentais era esperada devido ao grande erro experimental na medição de  $C_L^{exp}$  e à correlação entre  $C_L^{exp}$  e  $q^{exp}$  na Equação 41. Assim, um erro negativo na medição de  $C_L^{exp}$  leva a um desvio positivo no cálculo de  $q_{exp}$ . Usar  $q_{exp}$  como variável dependente na Equação 42 é uma abordagem questionável, pois os mínimos quadrados só derivam de inferência estatística (máxima verossimilhança clássica) se  $C_L^{exp}$  não for estocástico.

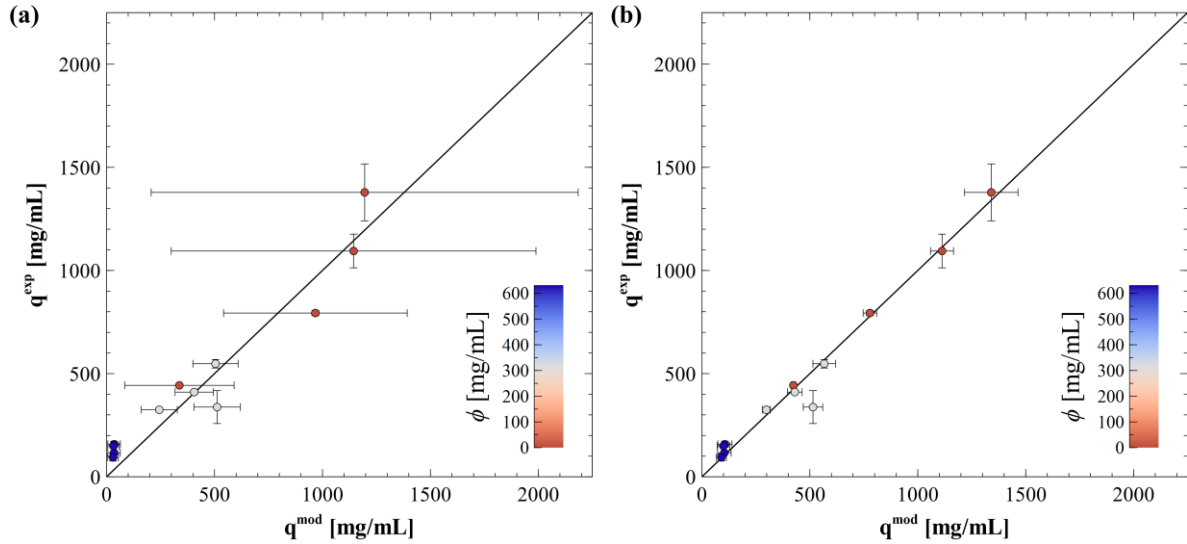
Os valores e o erro padrão de cada parâmetro obtido para as abordagens dos q-residuais e C-residuais podem ser observados na Tabela 5. Essa tabela mostra claramente uma incerteza menor nos parâmetros quando se usa a abordagem dos C-residuais.

**Tabela 5** - Os valores dos parâmetros estimados pelas abordagens dos q-residuais (Figura 29a) e C-residuais (Figura 29b) e o erro padrão (EP) de cada parâmetro.

Abordagem	$b_0$ [mL/mg]	$EP_{b_0}$ [mL/mg]	$S$ [mL/mg]	$EP_S$ [mL/mg]	$q_s$ [mg/mL]	$EP_{q_s}$ [mg/mL]
<b>q-residuais</b>	4,464	5,265	0,0105	0,00148	1334	706
<b>C-residuais</b>	0,867	0,412	0,0069	0,00058	2105	468

O intervalo de confiança da inferência do modelo é afetado pela abordagem de ajuste usada, conforme mostrado na Figura 30. O modelo da abordagem dos q-residuais, em que  $q^{exp}$  é a variável dependente, forneceu uma incerteza muito maior.

**Figura 30** - Dispersão média de dados e seu intervalo de confiança de 95% para as duas abordagens diferentes de estimativa de parâmetros de isoterma, A (a) e B (b).



Embora o erro padrão dos parâmetros diminua ao usar a abordagem C-residuais, a matriz de correlação (MC) permanece praticamente a mesma (Equações 69 e 70, Abordagens dos q-residuais e C-residuais, respectivamente).

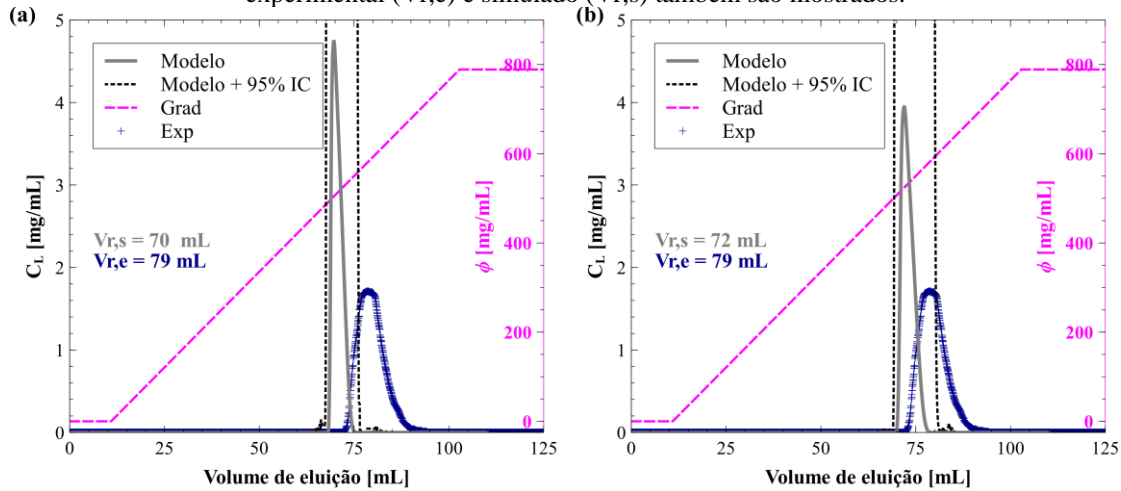
$$MC_A = \begin{bmatrix} 1 & 0,88 & -0,99 \\ 0,88 & 1 & -0,80 \\ -0,99 & -0,80 & 1 \end{bmatrix} \quad (69)$$

$$MC_B = \begin{bmatrix} 1 & 0,89 & -0,97 \\ 0,89 & 1 & -0,80 \\ -0,97 & -0,80 & 1 \end{bmatrix} \quad (70)$$

As linhas e colunas de  $MC_A$  and  $MC_B$  correspondem a  $b_0$ ,  $S$  e  $q_S$  de cima para baixo (linhas) e da esquerda para a direita (colunas), respectivamente. Em ambas as abordagens, as correlações dos parâmetros foram altas, especialmente entre  $b_0$  e  $q_S$ , o que é uma consequência da estrutura do modelo e do intervalo de dados amostrados.

Um ensaio de coluna cromatográfica sob eluição de gradiente foi utilizado para verificar a inferência do modelo (EDM/LSS). Os parâmetros estimados nas abordagens dos q-residuais e C-residuais foram aplicados nas simulações cromatográficas (Figura 31a e b, respectivamente). As outras variáveis utilizadas para simulação, exceto os parâmetros, foram apresentadas na Tabela 3.

**Figura 31** - Simulações cromatográficas empregando os parâmetros estimados pelas abordagens dos q-residuais (a) e C-residuais (b). O cromatograma experimental (Exp) já está corrigido pelos volumes  $D_{well}$  e  $D_{dead}$ . A curva de gradiente (Grad) está relacionada à escala do eixo y a direita. Os volumes de retenção experimental ( $V_{r,e}$ ) e simulado ( $V_{r,s}$ ) também são mostrados.



Os volumes de retenção do pico simulado ( $V_{r,s}$ ), utilizando os parâmetros obtidos pela abordagem dos q-residuais e C-residuais, foram de 70 mL e 72 mL, respectivamente (Figura 31). O que representa um desvio de 9% e 11% do volume de retenção experimental (79 mL). A inferência de retenção de volume é sensível aos parâmetros estimados pelo ensaio de microplacas. Por outro lado,  $D_a$  possui pouco efeito sobre a previsão de  $V_r$ , mas afeta o alargamento do pico. Para as simulações, foi usado  $D_a = 0,05 \text{ cm}^2/\text{min}$ . Esse valor foi calculado a partir do cromatograma experimental pela Equação 28. Não se esperava que esse valor representasse com precisão os efeitos de alargamento do pico, mas seria uma primeira estimativa de seu valor. Tanto que não é recomendado o emprego da Equação 27 para eluições por gradiente, somente eluições isocráticas (MEYER, 2010).

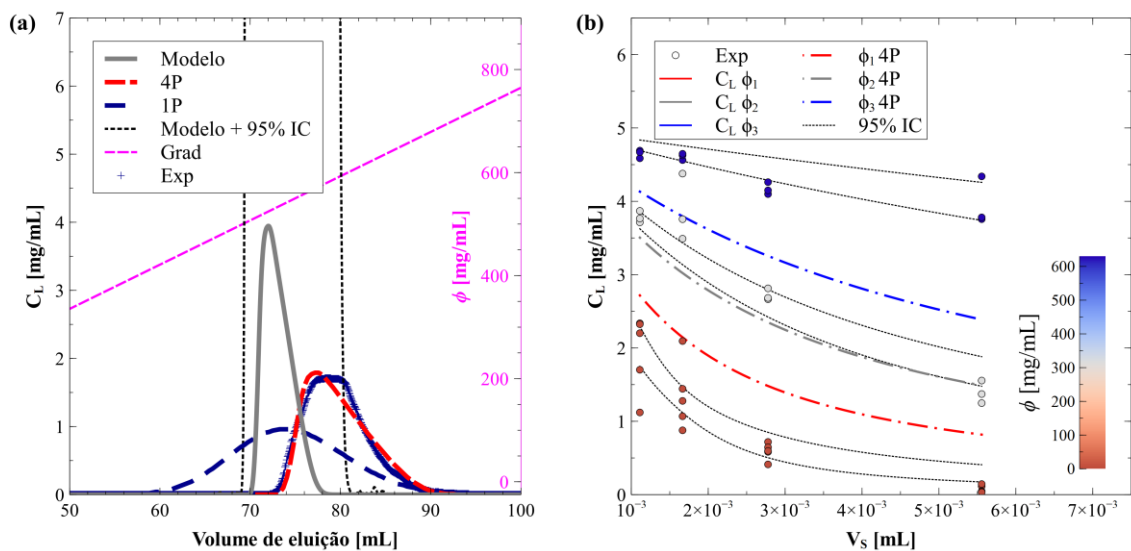
Em termos de estimativa média, os parâmetros de cada simulação eram diferentes (Tabela 5), mas levaram a respostas relativamente próximas (cromatogramas) para a operação da coluna (Figura 31a e b). No entanto, a incerteza dos parâmetros ajustados é menor na Abordagem C-residuais. Além disso, essa abordagem tem um fundamento estatístico, pois o resíduo entre a variável medida e o modelo é minimizado diretamente (CASSOL *et al.*, 2014b). Então, a Abordagem dos C-residuais foi escolhida para prosseguir com a estimativa conjunta.

#### 4.5. Estimativa conjunta: Re-estimação de parâmetros empregando dados de coluna de cromatografia combinados com triagem em microplacas

As simulações de cromatogramas (EDM/LSS) empregando parâmetros estimados a partir de experimentos em microplacas forneceram picos com retenções muito semelhantes às experimentais. Quando o EDM/LSS for candidato para descrever a coluna,  $D_a$  é o único parâmetro que não pode ser ajustado por meio de experimentos em batelada. Ou seja, o espalhamento do pico não pôde ser bem representado apenas com dados de microplacas.

A estimativa do  $D_a$  é necessária para permitir uma melhor previsão do cromatograma, uma vez que esse parâmetro é responsável pela dispersão do pico. Em seguida,  $D_a$  foi estimado empregando a abordagem MQC com os dados do cromatograma experimental, assumindo  $f$  definido na Equação 48. Aqui, a estimativa inicial utilizada para  $D_a$  também foi baseada na Equação 28. A previsão resultante é apresentada na Figura 32 como curva "1P".

**Figura 32** – Re-estimações pelo método inverso (aplicando MQC) empregando o EDM/LSS. (a) Modelo de cromatograma usando os parâmetros de estimativa inicial que foram estimados em microplacas (Modelo), o parâmetro único ( $\underline{\theta} = D_a$ ) reestimado (1P) e os quatro parâmetros ( $\underline{\theta} = D_a, b_0, S$  e  $q_s$ ) reestimados (4P). Todos foram comparados com o cromatograma experimental (Exp). Na linha pontilhada (Modelo +95% IC), o erro dos parâmetros estimados em batelada foi propagado no simulado (EDM/LSS); (b) Os parâmetros reestimados ( $C_L^{mod} \phi_1, \phi_2$  e  $\phi_3$  4P) foram comparados com os estimados na abordagem dos C-residuais pelas Equações 66 e 67. Os dados experimentais foram coloridos para corresponder às cores usadas nos modelos, indicando a concentração do modificador de cada ponto.



O novo valor de  $D_a$  (1P) apenas dispersou o pico, tendo baixo efeito sobre o volume de retenção (Figura 32), já que a retenção é afetada principalmente pelos parâmetros de

equilíbrio. A reestimativa dos parâmetros de equilíbrio é necessária para aprimorar a previsão do modelo do cromatograma e reduzir o erro de viés (*bias*) do volume de retenção.

Uma abordagem é reestimar todos os quatro parâmetros ( $D_a$ ,  $b_0$ ,  $S$  e  $q_s$ ) no chamado método inverso. Para isso, os parâmetros estimados a partir dos experimentos em microplacas foram aplicados como suposições iniciais (modelo) para reajustar os parâmetros usando os dados da coluna.

O resultado dessa abordagem é mostrado na Figura 32a (linha vermelha tracejada, 4P). Nesse caso, houve uma sobreposição entre a previsão do modelo e o cromatograma experimental. Embora esse resultado pareça ser o melhor cenário, os parâmetros de equilíbrio obtidos estão longe dos valores ajustados usando dados de microplacas. Na Figura 32b, os dados de equilíbrio previstos pela isoterma com esses parâmetros não estão circundados pelo intervalo de confiança para  $\phi_1$  e  $\phi_3$ , embora estejam próximos para  $\phi_2$  (Figura 32b). Isso pode indicar um ajuste excessivo (*overfitting*) aos dados do cromatograma, que também são suscetíveis às incertezas experimentais.

A incerteza do modelo usando os parâmetros estimados em microplacas já mostra uma boa previsão de retenção, mas ainda se beneficiaria das informações dos dados do cromatograma.

Uma abordagem adequada para combinar as informações das microplacas e dos dados da coluna é usar os mínimos quadrados ponderados (MQP), Equação 38 combinada com a Equação 49. Nesse caso, o erro do cromatograma é minimizado, mas um termo de penalidade é adicionado ao desvio dos parâmetros da isoterma em relação aos valores obtidos das microplacas.

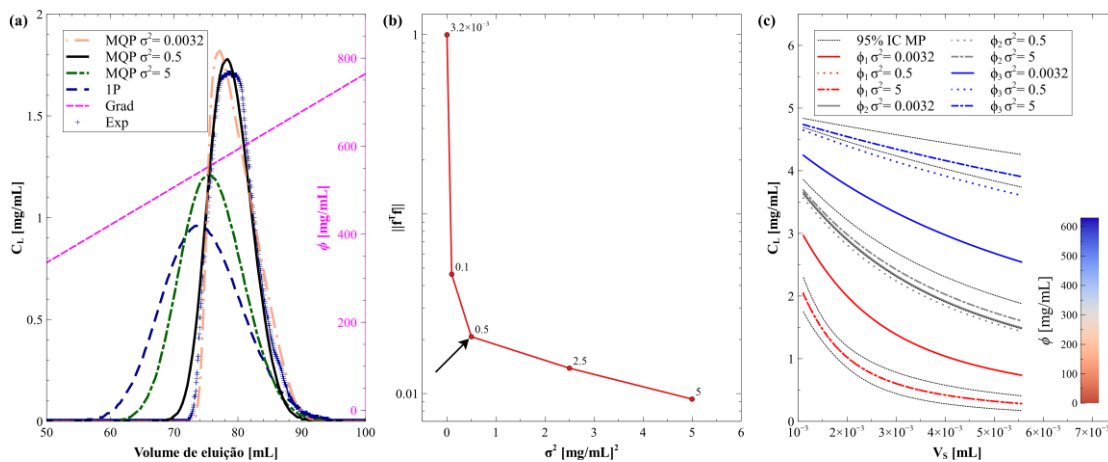
Uma parte da matriz de peso (Equação 50) está relacionada à incerteza do cromatograma ( $W_1$ ). A outra está relacionada à incerteza do conhecimento prévio dos parâmetros ( $W_2$ ).  $W_1$  é inicialmente assumido como  $I/\sigma^2$ , em que  $\sigma^2$  é o ruído do cromatograma e foi calculado como a variância do resíduo entre o cromatograma do pico experimental e uma curva gaussiana ajustada ( $\sigma^2 = 0,0032$  mg/mL).  $W_2$  é apresentado na Equação 71 e foi definido como o inverso da matriz de covariância de parâmetros estimada a partir do ajuste dos dados de microplaca. As linhas e colunas correspondentes ao parâmetro  $D_a$  foram consideradas zero, pois seu valor é desconhecido a priori (consulte a Seção 3.2.3.2)

$$W_2 = \begin{bmatrix} 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 245,38 & -5,39 \times 10^4 & 0,1560 \\ 0 & -5,39 \times 10^4 & 1,98 \times 10^7 & -26,414 \\ 0 & 0,1560 & -26,414 & 1,11 \times 10^{-4} \end{bmatrix} \quad (71)$$

Ao reestimar os parâmetros empregando  $\sigma^2 = 0,0032$  na estimação ponderada (MQP), os valores da concentração ( $C_L$ ) também estavam fora do intervalo de confiança de 95%, um problema encontrado na Figura 32b. Isso era de se esperar, pois o cálculo da variância do experimento da coluna não pode ser realmente representado com apenas um pico experimental. Portanto, durante o procedimento de re-estimação, diferentes pesos ( $\sigma^2 = 0,0032, 0,1, 0,5, 2,5$  e  $5$ ) foram aplicados à função objetivo do MQP.

Na Figura 33, o método da curva L foi empregado para determinar o melhor parâmetro  $\sigma^2$  para a função objetivo MQP. Com esse parâmetro, foi possível estimar em conjunto (experimentos de lote e coluna) com apenas um cromatograma experimental.

**Figura 33** - Estimativa conjunta dos parâmetros de cromatografia usando a função objetiva WLS: (a) Picos simulados dos parâmetros reestimados variando  $\sigma^2$  (parâmetro de ajuste de função objetiva). Para  $\sigma^2 = 0,0032$  (MQP  $\sigma^2 = 0,0032$ ),  $\sigma^2 = 0,5$  (MQP  $\sigma^2 = 0,5$ ),  $\sigma^2 = 5$  (MQP  $\sigma^2 = 5$ ) e comparado com a estimativa somente de  $D_a$  (1P, função objetiva MPC); (b) Curva L: variação do valor da função de custo (WLS) para diferentes valores de  $\sigma^2$ ; (c) modelo em microplacas utilizando os parâmetros reestimados para diferentes parâmetros de ajuste. A seta indica a interceptação da linha, o melhor valor para o parâmetro  $\sigma^2$ .



Na Figura 33b, a norma do valor da função objetivo (MQP) versus a  $\sigma^2$ , ambos em uma escala logarítmica, é avaliada, e o ponto de interseção de L ( $\sigma^2 = 0,5$ ) foi escolhido como o melhor parâmetro. O pico simulado MQP  $\sigma^2 = 0,5$  (linha preta sólida), empregando os parâmetros reestimados (Figura 33a), sobrepõe-se ao pico experimental e os valores dos parâmetros foram bem próximos (Tabela 6) dos estimados pela abordagem dos C-residuais (Tabela 5). Na Tabela 6 estão todos os valores dos parâmetros estimados

por MQC e MQP, e seus respectivos erros padrões (EP). É importante notar que cada abordagem e valor de  $\sigma^2$  fornece um conjunto diferente de valores de parâmetros.

**Tabela 6** – Valores dos parâmetros estimados e re-estimados. MQC: (re-estimativa a partir de experimentos em coluna) e MQP: re-estimados empregando a estimação conjunta com parâmetro de ajuste  $\sigma^2$  ) e o erro padrão (EP) de cada parâmetro.

Método de estimação	MQC 1P	MQC 4P	MQP	MQP	MQP
			$\sigma^2 = 0,0032$ [mg/mL] <sup>2</sup>	$\sigma^2 = 0,5$ [mg/mL] <sup>2</sup>	$\sigma^2 = 5$ [mg/mL] <sup>2</sup>
$D_a$ [cm <sup>2</sup> /min]	2,668	0,0599	0,0772	0,58042	1,5397
$EP_{D_a}$ [cm <sup>2</sup> /min]	<0,0001	<0,0001	0,0004	0,0003	0,0003
$b_0$ [mL/mg]	–	0,1901	0,3974	0,9303	0,9283
$EP_{b_0}$ [mL/mg]	–	<0,0001	0,0004	0,0003	0,0004
$S$ [mL/mg]	–	0,00209	0,00302	0,00632	0,00677
$EP_S$ [mL/mg]	–	<0,00001	0,00038	0,00046	0,00034
$q_s$ [mg/mL]	–	2542,45	1693,53	2052,03	2041,95
$EP_{q_s}$ [mg/mL]	–	<0,001	<0,001	0,001	<0,001

Os parâmetros reestimados foram inseridos no modelo de isotermas de equilíbrio da abordagem dos C-residuais para prever os resultados em microplaca e analisar o comportamento em relação ao intervalo de confiança dos parâmetros estimados anteriormente com resultados exclusivamente obtidos das bateladas (Figura 33c). Eles estão muito próximos do intervalo de confiança, o que justifica o uso da função MPQ.

Naturalmente, se  $\sigma^2$  for aumentado gradualmente, em algum momento, a re-estimação fornecerá um cromatograma próximo à previsão de apenas o ajuste de  $D_a$  (1P). Por exemplo, a reestimativa com  $\sigma^2 = 5$ , na Figura 33a, possui um pico muito próximo de 1P.

O erro padrão calculado para os parâmetros (Tabela 6), empregando no modelo de coluna, sofre grande influência do número de pontos que estão próximos de zero (concentração igual a zero). Quanto maior a quantidade de ponto no zero, mais próximo do zero foram os valores de EP. Vale a pena mencionar também que o ajuste utilizando MQP favoreceu aumentar os valores de EP, como se era esperado.

## 5. CONCLUSÃO

O trabalho propôs uma metodologia que leva em consideração tanto os dados de cromatograma quanto as informações de triagem por microplacas para estimativa de parâmetros de modelo fenomenológico para cromatografia. Para aplicar a metodologia, códigos de programação em Python para simulação cromatográfica foram desenvolvidos. Abordagens numéricas conhecidas se mostraram eficazes na solução do problema, evitando difusão numérica. No momento, o programa permite simulações de operações lineares e não lineares, com e sem gradiente para eluição. O gradiente utilizado é admitido como entrada, podendo ser alterado a depender da necessidade.

De modo a analisar a proposta de metodologia, a maneira adequada para ajustar os parâmetros de equilíbrio a partir dos ensaios de batelada em placas foi discutida. O método proposto para ajustar os parâmetros para a isoterma é próximo ao pico de cromatografia experimental. A aplicação da abordagem correta para estimar os parâmetros em batelada levou a menos incerteza nos parâmetros estimados.

Os métodos de estimação de parâmetros pelo balanço de massa (abordagem dos q-residuais) podem ser satisfatórios quando os dados não são tão ruidosos, no entanto, o desvio padrão desses parâmetros aumenta quando a interação sólido-líquido for alterada. Por exemplo, uma variação de fase móvel, concentração de analito ou tipo de resinas. Considerando que existem dados ruidosos, o procedimento proposto (abordagem dos C-residuais) tende a lidar melhor com esses dados. Além de fornecer parâmetros mais confiáveis sem a necessidade de remover muitas informações experimentais.

A abordagem proposta neste trabalho fornece uma estimativa de parâmetros rápida e eficiente. Este método não depende do uso de um manuseador de líquidos automatizado (LHS), que geralmente é um equipamento caro. Assim, o desenvolvimento de processos cromatográficos ou mesmo a otimização de um método existente pode ser facilitado empregando modelos fenomenológicos. Nesse aspecto, a proposta em questão contribui com a área, uma vez que um dos maiores problemas para aplicação de modelos desse tipo é a obtenção de seus parâmetros.

A re-estimação provou ser muito útil para corrigir os valores dos parâmetros da isoterma de equilíbrio. A estimativa de mínimos quadrados ponderados, avaliando tanto os experimentos de microplaca quanto de coluna, evita que os valores sejam estimados erroneamente. Mesmo com um modelo simplista (modelo de equilíbrio dispersivo

acoplado ao modelo LSS), o método provou ser eficaz para o desenvolvimento de técnicas de separação. É importante notar que o parâmetro de ajuste ( $\sigma^2$ ) contribui para estimar parâmetros mais próximos do cromatograma experimental e que é possível obter respostas satisfatórias de previsão do cromatograma com apenas um experimento de coluna, desde que sejam associados os dados de triagem.

O trabalho contribuiu para a aplicação de dados de triagem juntamente com dados de cromatograma para estimar um conjunto de parâmetros para modelar o processo de cromatografia com eluição gradiente. Como consequência, os resultados apresentados devem ser valiosos como um protocolo para manter todos os dados disponíveis para obter uma estimativa de parâmetros adequada para aplicações no próprio desenvolvimento. Além disso, a função de perda ponderada pode ser aplicada para evitar o ajuste excessivo dos dados do cromatograma.

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

ALTERN, Scott H.; WELSH, John P.; LYALL, Jessica Y.; KOCOT, Andrew J.; BURGESS, Sean; KUMAR, Vijesh; WILLIAMS, Chris; LENHOFF, Abraham M.; CRAMER, Steven M. Isotherm model discrimination for multimodal chromatography using mechanistic models derived from high-throughput batch isotherm data. **Journal of Chromatography A**, vol. 1693, p. 463878, Mar. 2023. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2023.463878>.

AMERSHAM BIOSCIENCES. **Ion Exchange Chromatography & Chromatofocusing: Principles and Methods**. [S. l.]: Amersham Biosciences Limited, 2004.

AMERSHAM BIOSCIENCES. **Protein Purification: Handbook**. Sweden: Uppsala, 2001.

ANDAR, Abhay U.; DELDARI, Sevda; GUTIERREZ, Erick; BURGENSEN, David; AL-ADHAMI, Mustafa; GURRAMKONDA, Chandrasekhar; TOLOSA, Leah; KOSTOV, Yordan; FREY, Douglas D.; RAO, Govind. Low-cost customizable microscale toolkit for rapid screening and purification of therapeutic proteins. **Biotechnology and Bioengineering**, vol. 116, no. 4, p. 870–881, 2019. <https://doi.org/10.1002/bit.26876>.

ARAKAWA, Tsutomu; TOMIOKA, Yui; KUROSAWA, Yasunori; AKUTA, Teruo. Elucidating the mechanisms of additive effects at high concentrations on hydrophobic interaction chromatography. **Journal of Chromatography A**, vol. 1702, p. 464091, Aug. 2023. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2023.464091>.

ÅSBERG, Dennis; LEŠKO, Marek; ENMARK, Martin; SAMUELSSON, Jörgen; KACZMARSKI, Krzysztof; FORNSTEDT, Torgny. Fast estimation of adsorption isotherm parameters in gradient elution preparative liquid chromatography. I: The single component case. **Journal of Chromatography A**, vol. 1299, p. 64–70, Jul. 2013. DOI 10.1016/j.chroma.2013.05.041. Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967313008091>.

BARKER, Gregory A.; CALZADA, Joseph; HERZER, Sibylle; RIEBLE, Siegfried. Adaptation to high throughput batch chromatography enhances multivariate screening. **Biotechnology Journal**, vol. 10, no. 9, p. 1493–1498, 2015. <https://doi.org/10.1002/biot.201400671>.

BEG, Sarwar. **Design of Experiments for Pharmaceutical Product Development**. Singapore: Springer Singapore, 2021. vol. I, . DOI 10.1007/978-981-33-4717-5. Available at: <http://link.springer.com/10.1007/978-981-33-4717-5>.

BEG, Sarwar; PANDA, Sagar Suman; KATARE, O. P.; SINGH, Bhupinder. Applications of Monte-Carlo simulation and chemometric techniques for development of bioanalytical liquid chromatography method for estimation of rosuvastatin calcium. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, vol. 40, no. 18, p. 907–920, 8 Nov. 2017. <https://doi.org/10.1080/10826076.2017.1382377>.

BENEDINI, Leandro J.; FIGUEIREDO, Douglas; CABRERA-CRESPO, Joaquin; GONÇALVES, Viviane M.; SILVA, Gabriel G.; CAMPANI, Gilson; ZANGIROLAMI, Teresa C.; FURLAN, Felipe F. Modeling and simulation of anion exchange chromatography for purification of proteins in complex mixtures. **Journal of Chromatography A**, vol. 1613, p. 460685, 22 Feb. 2020. <https://doi.org/10.1016/J.CHROMA.2019.460685>. Accessed on: 6 Oct. 2021.

BERNAU, C. R.; KNÖDLER, M.; EMONTS, J.; JÄPEL, R. C.; BUYEL, J. F. The use of predictive models to develop chromatography-based purification processes. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, vol. 10, 12 Oct. 2022. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.1009102>.

BESENHARD, Maximilian O.; TSATSE, Aikaterini; MAZZEI, Luca; SORENSEN, Eva. Recent advances in modelling and control of liquid chromatography. **Current Opinion in Chemical Engineering**, vol. 32, p. 100685, 1 Jun. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.coche.2021.100685>. Accessed on: 30 Jun. 2021.

BLUMBERG, Leonid M. Theory of Gradient Elution Liquid Chromatography with Linear Solvent Strength: Part 1. Migration and Elution Parameters of a Solute Band. **Chromatographia**, vol. 77, no. 1–2, p. 179–188, 28 Jan. 2014a. <https://doi.org/10.1007/s10337-013-2555-y>.

BLUMBERG, Leonid M. Theory of Gradient Elution Liquid Chromatography with Linear Solvent Strength: Part 2. Peak Width Formation. **Chromatographia**, vol. 77, no. 1–2, p. 189–197, 28 Jan. 2014b. <https://doi.org/10.1007/s10337-013-2556-x>.

BRANCH, Mary Ann; COLEMAN, Thomas F.; LI, Yuying. A Subspace, Interior, and Conjugate Gradient Method for Large-Scale Bound-Constrained Minimization Problems. **SIAM Journal on Scientific Computing**, vol. 21, no. 1, p. 1–23, Jan. 1999.

DOI 10.1137/S1064827595289108. Available at:  
<http://epubs.siam.org/doi/10.1137/S1064827595289108>.

BRHANE, Kewani Welay; QAMAR, Shamsul; SEIDEL-MORGENSTERN, Andreas. Two-Dimensional General Rate Model of Liquid Chromatography Incorporating Finite Rates of Adsorption-Desorption Kinetics and Core-Shell Particles. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, vol. 58, no. 19, p. 8296–8308, 2019.  
<https://doi.org/10.1021/acs.iecr.9b00364>.

BUYEL, Johannes F.; FISCHER, Rainer. Generic chromatography-based purification strategies accelerate the development of downstream processes for biopharmaceutical proteins produced in plants. **Biotechnology Journal**, vol. 9, no. 4, p. 566–577, 24 Apr. 2014. <https://doi.org/10.1002/biot.201300548>.

CALVETTI, D.; MORIGI, S.; REICHEL, L.; SGALLARI, F. Tikhonov regularization and the L-curve for large discrete ill-posed problems. **Journal of Computational and Applied Mathematics**, vol. 123, no. 1–2, p. 423–446, 1 Nov. 2000.  
[https://doi.org/10.1016/S0377-0427\(00\)00414-3](https://doi.org/10.1016/S0377-0427(00)00414-3). Accessed on: 29 Mar. 2023.

CASS, Q; CASSIANO, N. **Cromatografia Líquida: Novas Tendências e Aplicações**. [S. l.]: Elsevier Brasil, 2015. Available at:  
<https://books.google.com.br/books?id=FtysCQAAQBAJ>.

CASSOL, Guilherme; GALLON, Roger; SCHWAAB, Marcio; BARBOSA-COUTINHO, Elisa; JÚNIOR, João; PINTO, José. Statistical evaluation of non-linear parameter estimation procedures for adsorption equilibrium models. **Adsorption Science and Technology**, vol. 32, no. 4, p. 257–274, 2014a.  
<https://doi.org/10.1260/0263-6174.32.4.257>.

CASSOL, Guilherme; GALLON, Roger; SCHWAAB, Marcio; BARBOSA-COUTINHO, Elisa; JÚNIOR, João; PINTO, José. Statistical evaluation of non-linear parameter estimation procedures for adsorption equilibrium models. **Adsorption Science and Technology**, vol. 32, no. 4, p. 257–274, 2014b.  
<https://doi.org/10.1260/0263-6174.32.4.257>.

CHAN, Alan S.; DANQUAH, Michael K.; AGYEI, Dominic; HARTLEY, Patrick G.; ZHU, Yonggang. A Simple Microfluidic Chip Design for Fundamental Bioseparation. **Journal of Analytical Methods in Chemistry**, vol. 2014, p. 1–6, 2014.  
<https://doi.org/10.1155/2014/175457>.

CHERNEV, Valentin Plamenov; VANDE WOUWER, Alain; KIENLE, Achim. Efficient Simulation of Chromatographic Processes Using the Conservation Element/Solution Element Method. **Processes**, vol. 8, no. 10, p. 1316, 20 Oct. 2020. DOI 10.3390/pr8101316. Available at: <https://www.mdpi.com/2227-9717/8/10/1316>.

DE LUCA, Chiara; FELLETTI, Simona; MACIS, Marco; CABRI, Walter; LIEVORE, Giulio; CHENET, Tatiana; PASTI, Luisa; MORBIDELLI, Massimo; CAVAZZINI, Alberto; CATANI, Martina; RICCI, Antonio. Modeling the nonlinear behavior of a bioactive peptide in reversed-phase gradient elution chromatography. **Journal of Chromatography A**, vol. 1616, p. 460789, 12 Apr. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2019.460789>. Accessed on: 17 Jun. 2021.

DEBRUS, Benjamin; LEBRUN, Pierre; CECCATO, Attilio; CALIARO, Gabriel; ROZET, Eric; NISTOR, Iolanda; OPREAN, Radu; RUPÉREZ, Francisco J.; BARBAS, Coral; BOULANGER, Bruno; HUBERT, Philippe. Application of new methodologies based on design of experiments, independent component analysis and design space for robust optimization in liquid chromatography. **Analytica Chimica Acta**, vol. 691, no. 1–2, p. 33–42, 2011. DOI 10.1016/j.aca.2011.02.035. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2011.02.035>.

DONDI, Francesco; MUNARI, Pietro; REMELLI, Maurizio; CAVAZZINI, Alberto. Monte Carlo Model of Nonlinear Chromatography. **Analytical Chemistry**, vol. 72, no. 18, p. 4353–4362, 1 Sep. 2000. <https://doi.org/10.1021/ac0003347>.

FELINGER, Attila; ZHOU, Dongmei; GUIOCHON, Georges. Determination of the single component and competitive adsorption isotherms of the 1-indanol enantiomers by the inverse method. **Journal of Chromatography A**, vol. 1005, no. 1–2, p. 35–49, Jul. 2003. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(03\)00889-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(03)00889-6).

FIELD, Nicholas; KONSTANTINIDIS, Spyridon; VELAYUDHAN, Ajoy. High-throughput investigation of single and binary protein adsorption isotherms in anion exchange chromatography employing multivariate analysis. **Journal of Chromatography A**, vol. 1510, p. 13–24, Aug. 2017. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2017.06.012>.

FORSSÉN, P.; ARNELL, R.; FORNSTEDT, T. An improved algorithm for solving inverse problems in liquid chromatography. **Computers & Chemical Engineering**, vol. 30, no. 9, p. 1381–1391, Jul. 2006. DOI 10.1016/j.compchemeng.2006.03.004. Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0098135406000561>.

GALLANT, Stuart R.; KUNDU, Amitava; CRAMER, Steven M. Modeling non-linear elution of proteins in ion-exchange chromatography. **Journal of Chromatography A**, vol. 702, no. 1–2, p. 125–142, May 1995. [https://doi.org/10.1016/0021-9673\(94\)00992-I](https://doi.org/10.1016/0021-9673(94)00992-I).

GE HEALTHCARE. Hydrophobic Interaction and Reversed Phase Chromatography. **GE HealthCare Handbooks**, vol. 1, p. 164, 2006. Available at: [www.gehealthcare.com/protein-purification](http://www.gehealthcare.com/protein-purification)[www.gehealthcare.com/GEHealthcareBio-SciencesAB](http://www.gehealthcare.com/GEHealthcareBio-SciencesAB),.

GE HEALTHCARE. **Strategies for Protein Purification**. Handbooks. Uppsala: GE Healthcare, 2010.

GHORBANI, Javad; WENTZELL, Peter D.; KOMPANY-ZAREH, Mohsen; OMIDIKIA, Nematollah. Coupling of multivariate curve resolution-alternating least squares and mechanistic hard models to investigate antibody purification from human plasma using ion exchange chromatography. **Journal of Chromatography A**, vol. 1675, p. 463168, Jul. 2022. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2022.463168>.

GOLSHAN-SHIRAZI, S.; GUIOCHON, G. The Equilibrium-Dispersive Model of Chromatography. **Theoretical Advancement in Chromatography and Related Separation Techniques**, , p. 35–59, 1992. [https://doi.org/10.1007/978-94-011-2686-1\\_2](https://doi.org/10.1007/978-94-011-2686-1_2).

GOLSHAN-SHIRAZI, S.; GUIOCHON, Georges. Modeling of preparative liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, vol. 658, no. 2, p. 149–171, 14 Jan. 1994. [https://doi.org/10.1016/0021-9673\(94\)80013-8](https://doi.org/10.1016/0021-9673(94)80013-8). Accessed on: 16 Jun. 2021.

GONZÁLEZ-GONZÁLEZ, Mirna; RITO-PALOMARES, Marco. Advances, current challenges, and future trends in bioseparation: perspective analysis of the papers published in JCTB. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, vol. 97, no. 3, p. 558–560, 8 Mar. 2022. <https://doi.org/10.1002/jctb.6898>.

GRITTI, Fabrice. Perspective on the Future Approaches to Predict Retention in Liquid Chromatography. **Analytical Chemistry**, vol. 93, no. 14, p. 5653–5664, 2021. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.0c05078>.

GRITTI, Fabrice; GUIOCHON, Georges. Exact peak compression factor in linear gradient elution. **Journal of Chromatography A**, vol. 1212, no. 1–2, p. 35–40, Nov. 2008. DOI 10.1016/j.chroma.2008.09.113. Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967308016749>.

GU, Tingyue. **Mathematical Modeling and Scale-Up of Liquid Chromatography**. 2nd ed. New York: Springer, 2015. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-16145-7\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-319-16145-7_2).

GUIOCHON, Georges; FELINGER, Attila; SHIRAZI, Dean G.; KATTI, Anita M. **Fundamentals of Preparative and Nonlinear Chromatography**. 2nd ed. [S. l.]: Academic Press, 2006.

HADDAD, Paul R.; TARAJI, Maryam; SZÜCS, Roman. Prediction of Analyte Retention Time in Liquid Chromatography. **Analytical Chemistry**, vol. 93, no. 1, p. 228–256, 2021. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.0c04190>.

HAGHPANAH, Reza; RAJENDRAN, Arvind; FAROOQ, Shamsuzzaman; KARIMI, Iftekar A.; AMANULLAH, Mohammad. Discrete equilibrium data from dynamic column breakthrough experiments. **Separations Division - Core Programming Topic at the 2011 AIChE Annual Meeting**, vol. 2, p. 725, 2011. .

HAHN, Tobias; HUUK, Thiemo; HEUVELINE, Vincent; HUBBUCH, Jürgen. Simulating and Optimizing Preparative Protein Chromatography with ChromX. **Journal of Chemical Education**, vol. 92, no. 9, p. 1497–1502, 8 Sep. 2015. <https://doi.org/10.1021/ed500854a>.

HAHN, Tobias; HUUK, Thiemo; OSBERGHAUS, Anna; DONINGER, Katharina; NATH, Susanne; HEPBILDIKLER, Stefan; HEUVELINE, Vincent; HUBBUCH, Jürgen. Calibration-free inverse modeling of ion-exchange chromatography in industrial antibody purification. **Engineering in Life Sciences**, vol. 16, no. 2, p. 107–113, 13 Mar. 2016. <https://doi.org/10.1002/elsc.201400248>.

HARRISON, Roger; TODD, Paul; RUDGE, Scott; PETRIDES, Demetri. **Bioseparations science and engineering**. [S. l.: s. n.], 2015.

HEYMANN, William; GLASER, Juliane; SCHLEGEL, Fabrice; JOHNSON, Will; ROLANDI, Pablo; VON LIERES, Eric. Advanced score system and automated search strategies for parameter estimation in mechanistic chromatography modeling. **Journal**

of **Chromatography A**, vol. 1661, p. 462693, Jan. 2022.  
<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2021.462693>.

HØRSHOLT, A.; CHRISTIANSEN, L. H.; MEYER, K.; HUUSOM, J. K.; JØRGENSEN, J. B. A discontinuous-galerkin finite-element method for simulation of packed bed chromatographic processes. 52., Apr. 2019. **IFAC-PapersOnLine** [...]. [S. l.]: Elsevier B.V., Apr. 2019. vol. 52, p. 346–351.  
<https://doi.org/10.1016/j.ifacol.2019.06.086>.

HORSHOLT, Alexander; CHRISTIANSEN, Lasse Hjuler; MEYER, Kristian; HUUSOM, Jakob Kjobsted; JØRGENSEN, John Bagterp. Spatial discretization and kalman filtering for ideal packed-bed chromatography. Jun. 2019. **2019 18th European Control Conference, ECC 2019** [...]. [S. l.: s. n.], Jun. 2019. p. 2356–2361.  
<https://doi.org/10.23919/ECC.2019.8796219>.

HOUDE, Damian J.; BERKOWITZ, Steven A. **Biophysical characterization of proteins in developing biopharmaceuticals**. 2nd Editio. [S. l.]: Elsevier, 2019.  
<https://doi.org/10.1016/C2017-0-03008-2>.

HUBBUCH, Jürgen. Editorial: High-throughput process development. **Biotechnology Journal**, vol. 7, no. 10, p. 1185–1185, Oct. 2012. DOI 10.1002/biot.201200333.  
Available at: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/biot.201200333>.

HUUK, Thiemo C.; BRISKOT, Till; HAHN, Tobias; HUBBUCH, Jürgen. A versatile noninvasive method for adsorber quantification in batch and column chromatography based on the ionic capacity. **Biotechnology Progress**, vol. 32, no. 3, p. 666–677, May 2016. <https://doi.org/10.1002/btpr.2228>.

HUUK, Thiemo C.; HAHN, Tobias; DONINGER, Katharina; GRIESBACH, Jan; HEPBILDIKLER, Stefan; HUBBUCH, Jürgen. Modeling of complex antibody elution behavior under high protein load densities in ion exchange chromatography using an asymmetric activity coefficient. **Biotechnology Journal**, vol. 12, no. 3, p. 1600336, Mar. 2017. <https://doi.org/10.1002/biot.201600336>.

JANDERA, Pavel; KUČEROVÁ, Zdeňka; URBAN, Jiří. Retention times and bandwidths in reversed-phase gradient liquid chromatography of peptides and proteins. **Journal of Chromatography A**, vol. 1218, no. 49, p. 8874–8889, Dec. 2011.  
<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.06.064>.

JANSON, Jan-Christer. **Protein purification: principles, high-resolution methods, and applications**. 3rd ed. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc., 2011. vol. 36, .

JAVEED, Shumaila; QAMAR, Shamsul; SEIDEL-MORGENSTERN, Andreas; WARNECKE, Gerald. Efficient and accurate numerical simulation of nonlinear chromatographic processes. **Computers and Chemical Engineering**, vol. 35, no. 11, p. 2294–2305, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.compchemeng.2010.10.002>.

JAVEED, Shumaila; QAMAR, Shamsul; SEIDEL-MORGENSTERN, Andreas; WARNECKE, Gerald. Parametric study of thermal effects in reactive liquid chromatography. **Chemical Engineering Journal**, vol. 191, no. September 2018, p. 426–440, 2012. DOI 10.1016/j.cej.2012.02.040. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cej.2012.02.040>.

KACZMARSKI, Krzysztof; CHUTKOWSKI, Marcin. Note of solving Equilibrium Dispersive model with the Craig scheme for gradient chromatography case. **Journal of Chromatography A**, vol. 1629, p. 461504, 11 Oct. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2020.461504>. Accessed on: 19 Jun. 2021.

KALISZAN, Roman. QSRR: Quantitative structure-(chromatographic) retention relationships. **Chemical Reviews**, vol. 107, no. 7, p. 3212–3246, Jul. 2007. <https://doi.org/10.1021/cr068412z>.

KARLSSON, David; JAKOBSSON, Niklas; BRINK, Karl-Johan; AXELSSON, Anders; NILSSON, Bernt. Methodologies for model calibration to assist the design of a preparative ion-exchange step for antibody purification. **Journal of Chromatography A**, vol. 1033, no. 1, p. 71–82, Apr. 2004. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2003.12.072>.

KASEMIIRE, Alice; AVOHOU, Hermene T.; DE BLEYE, Charlotte; SACRE, Pierre Yves; DUMONT, Elodie; HUBERT, Philippe; ZIEMONS, Eric. Design of experiments and design space approaches in the pharmaceutical bioprocess optimization. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, vol. 166, no. June, p. 144–154, 2021. DOI 10.1016/j.ejpb.2021.06.004. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2021.06.004>.

KOBER, Roger; SCHWAAB, Marcio; STEFFANI, Evandro; BARBOSA-COUTINHO, Elisa; PINTO, José Carlos. D-optimal experimental designs for precise parameter estimation of adsorption equilibrium models: initial concentration and solvent volume

to adsorbent mass ratio as independent variables. **Adsorption**, no. 0123456789, 2021. <https://doi.org/10.1007/s10450-021-00325-9>.

KOBER, Roger; SCHWAAB, Marcio; STEFFANI, Evandro; BARBOSA-COUTINHO, Elisa; PINTO, José Carlos; ALBERTON, André Luís. D-optimal experimental designs for precise parameter estimation of adsorption equilibrium models. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, vol. 192, no. May, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.chemolab.2019.103823>.

KOCH, Jonas; SCHEPS, Daniel; GUNNE, Matthias; BOSCHEINEN, Oliver; HAFNER, Mathias; FRECH, Christian. Mechanistic modeling and simulation of a complex low and high loading elution behavior of a polypeptide in cation exchange chromatography. **Journal of Separation Science**, vol. 45, no. 12, p. 2008–2023, 6 Jun. 2022. <https://doi.org/10.1002/jssc.202200098>.

KRCMOVA, Lenka; SOLICHOVA, Dagmar; SOLICH, Petr. Microplates in liquid chromatography - New solution in clinical research? - A review. **Talanta**, vol. 115, p. 973–979, 2013. DOI 10.1016/j.talanta.2013.06.048. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2013.06.048>.

KUMAR, Vijesh; LEWEKE, Samuel; VON LIERES, Eric; RATHORE, Anurag S. Mechanistic modeling of ion-exchange process chromatography of charge variants of monoclonal antibody products. **Journal of Chromatography A**, vol. 1426, p. 140–153, 24 Dec. 2015. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2015.11.062>.

ŁAÇKI, Karol M. High throughput process development in biomanufacturing. **Current Opinion in Chemical Engineering**, vol. 6, p. 25–32, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.coche.2014.08.004>.

ŁAÇKI, Karol M. High-throughput process development of chromatography steps: Advantages and limitations of different formats used. **Biotechnology Journal**, vol. 7, no. 10, p. 1192–1202, 2012. <https://doi.org/10.1002/biot.201100475>.

LEWEKE, Samuel; VON LIERES, Eric. Chromatography Analysis and Design Toolkit (CADET). **Computers and Chemical Engineering**, vol. 113, p. 274–294, 8 May 2018. <https://doi.org/10.1016/j.compchemeng.2018.02.025>.

LIETTA, Elena; PIERI, Alessandro; CARDILLO, Antonio G.; VANNI, Marco; PISANO, Roberto; BARRESI, Antonello A. An Experimental and Modeling Combined Approach in Preparative Hydrophobic Interaction Chromatography. **Processes**, vol. 10, no. 5, p. 1027, 20 May 2022. <https://doi.org/10.3390/pr10051027>.

LIU, Zheng; ROININEN, Jonas; PULKKINEN, Iiro; SAINIO, Tuomo; ALOPÆUS, Ville. Moment based weighted residual method—New numerical tool for a nonlinear multicomponent chromatographic general rate model. **Computers & Chemical Engineering**, vol. 53, p. 153–163, Jun. 2013. <https://doi.org/10.1016/j.compchemeng.2013.02.008>.

LÓPEZ C., Diana C.; BARZ, Tilman; KÖRKEL, Stefan; WOZNY, Günter. Nonlinear ill-posed problem analysis in model-based parameter estimation and experimental design. **Computers & Chemical Engineering**, vol. 77, p. 24–42, Jun. 2015. <https://doi.org/10.1016/j.compchemeng.2015.03.002>.

M. SCHWAAB AND J.C. PINTO. **Análise de Dados Experimentais - Volume I Fundamentos de Estatística**. [S. l.: s. n.], 2007.

MEDI, Bijan; AMANULLAH, Mohammad. Application of a finite-volume method in the simulation of chromatographic systems: Effects of flux limiters. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, vol. 50, no. 3, p. 1739–1748, 2011. <https://doi.org/10.1021/ie100617c>.

MELANDER, Wayne R.; EL RASSI, Ziad; HORVÁTH, Csaba. Interplay of hydrophobic and electrostatic interactions in biopolymer chromatography. **Journal of Chromatography A**, vol. 469, p. 3–27, Jan. 1989. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)96437-4](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)96437-4).

MEYER, Veronika R. **Practical High-Performance Liquid Chromatography**. [S. l.]: Wiley, 2010. <https://doi.org/10.1002/9780470688427>.

MOLLERUP, Jørgen M. A Review of the Thermodynamics of Protein Association to Ligands, Protein Adsorption, and Adsorption Isotherms. **Chemical Engineering & Technology**, vol. 31, no. 6, p. 864–874, Jun. 2008. <https://doi.org/10.1002/ceat.200800082>.

MOLLERUP, Jørgen M.; HANSEN, Thomas Budde; KIDAL, Steffen; SEJERGAARD, Lars; STABY, Arne. Development, modelling, optimisation and scale-up of chromatographic purification of a therapeutic protein. **Fluid Phase Equilibria**, vol. 261, no. 1–2, p. 133–139, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.fluid.2007.07.047>.

NELLES, Oliver. **Nonlinear System Identification**. 2nd ed. Cham, Switzerland: Springer Nature, 2020. DOI 10.1007/978-3-662-04323-3. Available at: <http://link.springer.com/10.1007/978-3-662-04323-3>.

NFOR, Beckley K; AHAMED, Tangir; VAN DEDEM, Gijis WK; VAN DER WIELEN, Luuk AM; VAN DE SANDT, Emile JAX; EPPINK, Michel HM; OTTENS, Marcel. Design strategies for integrated protein purification processes: Challenges, progress and outlook. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, vol. 83, no. 2, p. 124–132, Feb. 2008. <https://doi.org/10.1002/jctb.1815>.

NFOR, Beckley K.; VERHAERT, Peter D.E.M.; VAN DER WIELEN, Luuk A.M.; HUBBUCH, Jürgen; OTTENS, Marcel. Rational and systematic protein purification process development: the next generation. **Trends in Biotechnology**, vol. 27, no. 12, p. 673–679, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2009.09.002>.

OSBERGHAUS, A.; HEPBILDIKLER, S.; NATH, S.; HAINDL, M.; VON LIERES, E.; HUBBUCH, J. Determination of parameters for the steric mass action model—A comparison between two approaches. **Journal of Chromatography A**, vol. 1233, p. 54–65, Apr. 2012a. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.02.004>.

OSBERGHAUS, A.; HEPBILDIKLER, S.; NATH, S.; HAINDL, M.; VON LIERES, E.; HUBBUCH, J. Optimizing a chromatographic three component separation: A comparison of mechanistic and empiric modeling approaches. **Journal of Chromatography A**, vol. 1237, p. 86–95, 11 May 2012b. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.03.029>.

PETRIDES, DP; COONEY, CL; EVANSM, LB. **An introduction to biochemical process design. Chemical Engineering Problems in Biotechnology**. [S. l.]: American Institute of Chemical Engineers: New York, 1989. vol. 1, .

POOLE, Colin F.; ATAPATTU, Sanka N. Determination of physicochemical properties of small molecules by reversed-phase liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, vol. 1626, p. 461427, Aug. 2020. DOI

10.1016/j.chroma.2020.461427. Available at:  
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967320307032>.

PRIMDAHL, Karoline Gangestad; HANSEN, Frederik André; SOLUM, Eirik Johansson; NOLSØE, Jens Mortansson Jelstrup; AURSNES, Marius. Introduction to Preparative Chromatography: Description of a Setup with Continuous Detection. **Journal of Chemical Education**, vol. 99, no. 6, p. 2372–2377, 14 Jun. 2022. <https://doi.org/10.1021/acs.jchemed.1c00917>.

QAMAR, Shamsul; SATTAR, Fouzia Abdul; ABBASI, Javeria Nawaz; SEIDEL-MORGENSTERN, Andreas. Numerical simulation of nonlinear chromatography with core-shell particles applying the general rate model. **Chemical Engineering Science**, vol. 147, p. 54–64, 2016. DOI 10.1016/j.ces.2016.03.027. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ces.2016.03.027>.

RAJENDRAN, Arvind; MARUYAMA, Rafael Teruo; LANDA, Héctor Octavio Rubiera; SEIDEL-MORGENSTERN, Andreas. Modelling binary non-linear chromatography using discrete equilibrium data. **Adsorption**, vol. 26, no. 7, p. 973–987, 7 Oct. 2020. DOI 10.1007/s10450-020-00220-9. Available at: <http://link.springer.com/10.1007/s10450-020-00220-9>.

RISCHAWY, Federico; SALEH, David; HAHN, Tobias; OELMEIER, Stefan; SPITZ, Julia; KLUTERS, Simon. Good modeling practice for industrial chromatography: Mechanistic modeling of ion exchange chromatography of a bispecific antibody. **Computers and Chemical Engineering**, vol. 130, 2 Nov. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.compchemeng.2019.106532>.

ROCH, Patricia; SELLBERG, Anton; ANDERSSON, Niklas; GUNNE, Matthias; HAUPTMANN, Peter; NILSSON, Bernt; MANDENIUS, Carl Fredrik. Model-based monitoring of industrial reversed phase chromatography to predict insulin variants. **Biotechnology Progress**, vol. 35, no. 4, p. 1–10, 2019. <https://doi.org/10.1002/btpr.2813>.

ROQUE, Ana Cecília Afonso; PINA, Ana Sofia; AZEVEDO, Ana Margarida; AIRES-BARROS, Raquel; JUNGBAUER, Alois; DI PROFIO, Gianluca; HENG, Jerry Y.Y.; HAIGH, Jonathan; OTTENS, Marcel. Anything but Conventional Chromatography Approaches in Bioseparation. **Biotechnology Journal**, vol. 15, no. 8, p. 1–8, 2020. <https://doi.org/10.1002/biot.201900274>.

SANCHEZ-REYES, Gabriela; GRAALFS, Heiner; HAFNER, Mathias; FRECH, Christian. Mechanistic modeling of ligand density variations on anion exchange chromatography. **Journal of Separation Science**, vol. 44, no. 4, p. 805–821, 30 Feb. 2021. <https://doi.org/10.1002/jssc.202001077>.

SHEKHAWAT, Lalita K.; MARKLE, Todd; ESFANDIARFARD, Keyhan; THEEL, Eike Kristian; MALOISEL, Jean-Luc; MALMQUIST, Gunnar. Next generation multimodal chromatography resins via an iterative mapping approach: Chemical diversity, high-throughput screening, and chromatographic modelling. **Journal of Chromatography A**, vol. 1699, p. 464018, Jun. 2023. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2023.464018>.

SHEKHAWAT, Lalita K.; RATHORE, Anurag S. An overview of mechanistic modeling of liquid chromatography. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, vol. 49, no. 6, p. 623–638, 2019. <https://doi.org/10.1080/10826068.2019.1615504>.

SILVA, Tiago Castanheira; EPPINK, Michel; OTTENS, Marcel. Automation and miniaturization: enabling tools for fast, high-throughput process development in integrated continuous biomanufacturing. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, no. March, 2021. <https://doi.org/10.1002/jctb.6792>.

SNYDER, Lloyd R.; DOLAN, John W. **High-Performance Gradient Elution: The Practical Application of the Linear-Solvent-Strength Model**. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc., 2007.

STABY, Arne; RATHORE, Anurag S.; AHUJA, Satinder (Eds.). **Preparative Chromatography for Separation of Proteins**. New Jersey: John Wiley and Sons, 2017. <https://doi.org/10.1002/9781119031116>.

TANG, Zhonghua; ZHANG, Zhifei; ZAN, Ming; XU, Zhongming; XU, Enyong. The determination of the regularization parameter based on signal-to-noise ratio in load identification. **Journal of Vibration and Control**, vol. 29, no. 19–20, p. 4479–4491, 22 Oct. 2023. <https://doi.org/10.1177/10775463221122087>.

TOLAZZI, Natália; STEFFANI, Evandro; BARBOSA-COUTINHO, Elisa; SEVERO JÚNIOR, João B.; PINTO, José Carlos; SCHWAAB, Marcio. Adsorption equilibrium models: Computation of confidence regions of parameter estimates. **Chemical Engineering Research and Design**, vol. 138, p. 144–157, Oct. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.cherd.2018.08.027>.

VAN HOECKE, Laurens; BOEYE, Dieter; GONZALEZ-QUIROGA, Arturo; PATIENCE, Gregory S.; PERREAULT, Patrice. Experimental methods in chemical engineering: Computational fluid dynamics/finite volume method—CFD/FVM. **The Canadian Journal of Chemical Engineering**, vol. 101, no. 2, p. 545–561, 27 Feb. 2023. <https://doi.org/10.1002/cjce.24571>.

VIEIRA, Fabiola Sulpino; SANTOS, Maria Angelica Borges dos. O Setor Farmacêutico no Brasil sob as Lentes da Conta-satélite de Saúde. **Texto para Discussão**, , p. 1–74, 18 Nov. 2020. <https://doi.org/10.38116/td2615>.

VON LIERES, Eric; ANDERSSON, Joel. A fast and accurate solver for the general rate model of column liquid chromatography. **Computers & Chemical Engineering**, vol. 34, no. 8, p. 1180–1191, Aug. 2010. <https://doi.org/10.1016/j.compchemeng.2010.03.008>.

WALSH, Gary; WALSH, Eithne. Biopharmaceutical benchmarks 2022. **Nature Biotechnology**, vol. 40, no. 12, p. 1722–1760, 5 Dec. 2022. <https://doi.org/10.1038/s41587-022-01582-x>.

WANG, Aosheng; CARR, Peter W. Comparative study of the linear solvation energy relationship, linear solvent strength theory, and typical-conditions model for retention prediction in reversed-phase liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, vol. 965, no. 1–2, p. 3–23, Aug. 2002. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)01472-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)01472-8).

WANG, Gang; HAHN, Tobias; HUBBUCH, Jürgen. Water on hydrophobic surfaces: Mechanistic modeling of hydrophobic interaction chromatography. **Journal of Chromatography A**, vol. 1465, p. 71–78, 2016. DOI 10.1016/j.chroma.2016.07.085. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2016.07.085>.

## Lista de Símbolos

$C_i^*$	Concentração do componente $i$ na fase móvel em equilíbrio com a fase estacionária [mg/mL]
$C_{s,i}^*$	Concentração do componente $i$ na fase estacionária em equilíbrio com a fase móvel [mg/mL]
$C_{s,k}$	Concentração do componente $k$ na fase estacionária em equilíbrio com a fase móvel [mg/mL]
$\Gamma_{feed}$	Concentração de alimentação da coluna adimensionalizada
$\Gamma_{inj}$	Concentração de injeção da amostra adimensionalizada
$\Gamma_{j+1/2}$	Concentração adimensional da face da direita
$\Gamma_{j-1/2}$	Concentração adimensional da face da esquerda
$A_V$	Área do volume de controle [cm <sup>2</sup> ]
$A_c$	Área da seção transversal da coluna [cm <sup>2</sup> ]
$C_i$	Concentração do componente $i$ na fase móvel [mg/mL]
$C_{p,i}$	Concentração do componente $i$ na fase móvel dentro da partícula [mg/mL]
$C_{ref}$	Concentração de referência [mg/mL]
$C_{s,i}$	Concentração do componente $i$ na fase estacionária [mg/mL]
$D_{L,i}$	Dispersão axial [cm <sup>2</sup> /min]
$D_S$	Difusão na superfície da partícula
$D_a$	Dispersão aparente [cm <sup>2</sup> /min]
$D_{efetiva}$	Difusividade efetiva
$D_p$	Difusão molecular dos componentes nos poros
$Pe_a$	Número de Peclet para dispersão aparente
$S_i$	Constante relacionado a interação do componente $i$ nas fases móvel e estacionária [mL/mg]
$V_m$	Volume da fase móvel, ou também volume totais de vazios do leito [mL].
$V_s$	Volume da fase estacionária [mL].
$a_p$	Unidade de superfície externa das partículas por unidade de volume
$k_0$	Fator de retenção para um componente $i$ quando $\phi = 0$
$k_{a,i}$	Constante de adsorção do componente $i$ [mL.mg <sup>-1</sup> .min <sup>-1</sup> ]
$k_a$	Constante de adsorção [mL.mg <sup>-1</sup> .min <sup>-1</sup> ]
$k_{a0,i}$	Constante de adsorção do componente $i$ quando $\phi = 0$ [mL.mg <sup>-1</sup> .min <sup>-1</sup> ]
$k_c$	Coefficiente de transferência de massa do fluido para a partícula
$k_{d,i}$	Constante de dessorção do componente $i$ [mL.mg <sup>-1</sup> .min <sup>-1</sup> ]
$k_d$	Constante de dessorção [mL.mg <sup>-1</sup> .min <sup>-1</sup> ]

---

$k_{d0,i}$	Constante de dessorção do componente $i$ quando $\phi = 0$ [mL.mg <sup>-1</sup> .min <sup>-1</sup> ]
$k_f$	Coeficiente de transferência de massa aparente
$k_m$	Coeficiente de transferência de massa aparente
$q_{p,i}$	Concentração do componente $i$ na fase estacionária em equilíbrio com a fase móvel no interior do adsorvente
$q_{s,s}$	Concentração de saturação do componente em volume de sólido [mg/mL].
$q_s$	Concentração de saturação do componente em volume aparente de resina [mg/mL].
$r_c$	Raio da coluna [cm].
$r_p$	Raio do poro [cm].
$t_{G,inj}$	Tempo inicial que ocorre a injeção do solvente modificador de fase [min].
$t_T$	Tempo que um traçador percola a coluna sem interagir com a fase sólida [min].
$u_L$	Velocidade linear [cm/min]
$u_S$	Velocidade superficial [cm/min]
$u_{eff}$	Velocidade efetiva
$w_b$	Largura do pico na base (interceptação das retas na base) [cm]
$W_1$	Matriz peso da função objetivo correspondente ao erro dos picos cromatográficos simulado e experimental, ensaios em colunas
$W_2$	Matriz peso da função objetivo correspondente ao erro dos parâmetros de conhecimento a priori estimados pelos ensaios em colunas
$\beta_i$	Constante empírica adimensional responsáveis pelos efeitos eletrostáticos (carga do componente $i$ )
$\gamma_i$	Constante responsáveis pelos efeitos hidrofóbicos, semelhante ao $S_i$ [mL/mg]
$\varepsilon_I$	Porosidade dos interstícios do empacotamento
$\varepsilon_T$	Porosidade total do leito, $V_m/V_C$ , ou seja, mL de vazios por mL de coluna
$\varepsilon_p$	Porosidade dos poros
$\nu_i$	Carga característica da biomolécula, íons
$\sigma_i$	Fator de blindagem estérica
$\hat{\phi}_s$	Concentração adimensional de sal livre na fase sólida
$\hat{\phi}$	Concentração adimensional do modulador de sal na fase líquida
$\phi_s$	Concentração total de sal na fase sólida [mg/mL]
$\Delta t_g$	Tempo do gradiente (variação entre o tempo inicial e final do gradiente) [min].
$\Gamma$	Concentração adimensional
$\sigma$	Desvio padrão

$F$	Razão dos volumes da fase estacionária e móvel
$H$	Altura equivalente a um prato teórico
$L$	Comprimento da coluna
$N$	Número da placa da coluna ou a eficiência da coluna
$Q$	Vazão volumétrica da fase móvel
$a$	Constante de Henry
$b$	Constante de equilíbrio [mL/mg]
$i$	componente químico
$j$	número do nó do volume de controle, volume finito
$k$	Fator de retenção
$q$	Concentração da fase estacionária em equilíbrio com a fase móvel [mg/mL]
$\Lambda$	Capacidade iônica total da coluna [mg/mL]
$\Phi$	Limitador de fluxo
$\tau$	Tempo adimensional
$\chi$	Termo da posição adimensional
$\phi$	Concentração do modulador de fase [mg/mL]

**Lista de Abreviações**

BDF	<i>Backward differentiation formula</i>
DoE	<i>Design of Experiment</i>
DOP853	<i>Runge Kutta de ordem 8</i>
EDM	<i>Equilibrium Dispersive Model</i>
GRM	<i>General Rate Model</i>
HTPD	<i>High Throughput Process Development</i>
HTS	<i>High Throughput Screening</i>
IM	<i>Ideal Model</i>
LKM	<i>Lumped Kinetic Model</i>
LSS	<i>Linear Solvent Strength</i>
MPM	Modificador de Fase Móvel
OFaaT	<i>One-Factor-at-a-Time</i>
Radau	<i>Runge-Kutta da família Radau IIA de quinta ordem</i>
RK	<i>Runge Kutta</i>
RK45	<i>Runge Kutta de ordem 5</i>
SMA	<i>Steric Mass-Action</i>
TVD	<i>Total Variation Diminishing</i>
MQC	Mínimos Quadrados Clássicos
MQP	Mínimos Quadrados Ponderados

## Apêndice A – Predição da retenção de componentes em colunas cromatográficas

### A.1. Análise do fator de retenção para eluição isocrática

Se o termo de dispersão for negligenciado (IM) é possível focar na posição do pico para àquele componente. Deste modo, se descreve o fator de retenção para uma determinada composição de fase móvel (condição isocrática). Esse fator é um indicativo da interação molécula-sólido e mensurado em condições analíticas, de baixa carga. Portanto, o equilíbrio linear será adotado nessa seção.

Baseado no modelo ideal, a Equação 25 pode ser rearranjada para Equação 72 e o termo do colchete adicionado na constante da Equação 73, no qual  $q_i' = \partial q_i / \partial C_i$  e  $\psi$  represente toda retenção relacionada ao equilíbrio das fases e efeitos do meio poroso.

$$\frac{\partial C_i}{\partial t} \left[ 1 + \frac{(1-\varepsilon_T)}{\varepsilon_T} q_i'(C_i) \right] + u_L \frac{\partial C_i}{\partial z} = 0, \quad (72)$$

$$\psi = 1 / \left[ 1 + \frac{(1-\varepsilon_T)}{\varepsilon_T} q_i'(C_i) \right]. \quad (73)$$

O termo da velocidade efetiva ( $u_{eff}$ ) representa a velocidade com que o componente permeia a coluna e é definido como a multiplicação da velocidade linear ( $u_L$ ) por  $\psi$ , assim, se multiplicarmos a Equação 72 pela constante  $\psi$  tem-se a Equação 74.

$$\psi \left[ \frac{1}{\psi} \frac{\partial C_i}{\partial t} + u_L \frac{\partial C_i}{\partial z} \right] = 0,$$

$$\frac{\partial C_i}{\partial t} + u_{eff} \frac{\partial C_i}{\partial z} = 0. \quad (74)$$

O tempo em que o componente sai da coluna é chamado de tempo de retenção ( $t_R$ ). Assim, corresponde à razão do comprimento da coluna e a velocidade efetiva ( $L/u_{eff}$ ). O fator de retenção ( $k$ ) é definido pela diferença dos tempos de retenção de um componente e um traçador dividida pelo tempo de retenção do traçador (não retido, sem interação com a superfície do sólido), Equação 75.

$$k = \frac{t_R - t_T}{t_T}, \quad (75)$$

O tempo de retenção do traçador ( $t_T$ ) já foi mencionado na definição da Equação 22, relacionada à velocidade linear (ou cromatográfica). Então, ao substituir a relação dos tempos de retenção e do traçador tem-se o fator de retenção pela razão da constante  $\psi$ ,

Equação 76. Ao substituir a Equação 73 na 76 e rearranjando, o fator de retenção é por consequência definido pela isoterma de equilíbrio e razão de fases (Equação 77, abaixo).

$$k = \frac{L/u_{eff} - L/u_L}{L/u_L} = \frac{u_L}{u_{eff}} - 1 = \frac{u_L}{u_L \psi} - 1, \quad (76)$$

$$k = \frac{1-\psi}{\psi} = \frac{(1-\varepsilon_T)}{\varepsilon_T} q_i'(C_i). \quad (77)$$

## Apêndice B – Modelos fenomenológicos

### B.1. Modelos fenomenológicos de uma equação

#### B.1.1. Balanço de massa para modelos de uma equação

Nos modelos de uma equação (explicado na seção 2.6), considera-se que a coluna cromatográfica seja operada isotermicamente e que a diferença de concentração seja somente na direção axial, ou seja, radialmente homogêneo. A equação de balanço de massa contém duas variáveis independentes, sendo elas, o tempo ( $t$ ) e o comprimento da coluna ( $z$ ). O fluxo molar ( $N_{i,z}$ ) do componente  $i$  que entra no volume de controle é representada pela Equação 78.

$$N_{i,z} = \varepsilon_T A_c \left( u_L C_i - D_{L,i} \frac{\partial C_i}{\partial z} \right) \Big|_{z,t}, \quad (78)$$

em que,  $C_i$  é a concentração do componente  $i$  na fase móvel,  $z$  é referente a entrada do volume de controle e  $A_c$  área da seção transversal da coluna ( $A_c = \pi R_c^2$ ). O fluxo molar do soluto que sai do volume de controle é definido pela Equação 79 e a taxa de acúmulo pela Equação 80.

$$N_{i,z}|_{z+\Delta z} = \varepsilon_T A_c \left( u_L C_i - D_{L,i} \frac{\partial C_i}{\partial z} \right) \Big|_{z+\Delta z,t}, \quad (79)$$

$$A_c \Delta z \left( \varepsilon_T \frac{\partial C_i}{\partial t} + (1 - \varepsilon_T) \frac{\partial C_{s,i}}{\partial t} \right) \Big|_{\bar{z},t}, \quad (80)$$

em que,  $C_{s,i}$  é a concentração da fase estacionária, ou seja, do material poroso mais o componente  $i$  contido dentro da partícula,  $z + \Delta z$  é referente a saída do volume de controle e  $\bar{z}$  é o comprimento médio de cada volume de controle. Então, o balanço de massa para o componente  $i$  na fase móvel, considerando que exista somente adsorção física, Equação 81 e Equação 82.

$$\text{Entra} - \text{sai} = \text{acúmulo}, \quad (81)$$

$$\begin{aligned} & \varepsilon_T A_c \left( u_L C_i - D_{L,i} \frac{\partial C_i}{\partial z} \right) \Big|_{z,t} - \varepsilon_T A_c \left( u_L C_i - D_{L,i} \frac{\partial C_i}{\partial z} \right) \Big|_{z+\Delta z,t} \\ & = A_c \Delta z \left( \varepsilon_T \frac{\partial C_i}{\partial t} + (1 - \varepsilon_T) \frac{\partial C_{s,i}}{\partial t} \right) \Big|_{\bar{z},t}. \end{aligned} \quad (82)$$

Se dividir a Equação 82 por  $\varepsilon_T A_c \Delta z$ , obtém-se a Equação 83.

$$\frac{u_L C_i|_{z,t} - D_{L,i} \frac{\partial C_i}{\partial z}|_{z,t}}{\Delta z} - \frac{u_L C_i|_{z+\Delta z,t} - D_{L,i} \frac{\partial C_i}{\partial z}|_{z+\Delta z,t}}{\Delta z} = \frac{\partial C_i}{\partial t}|_{\bar{z},t} + \frac{(1-\varepsilon_T)}{\varepsilon_T} \frac{\partial C_{s,i}}{\partial t}|_{\bar{z},t} \quad (83)$$

Reorganizando a Equação 83, tem-se a Equação 84.

$$\frac{\partial C_i}{\partial t}|_{\bar{z},t} + \frac{(1-\varepsilon_T)}{\varepsilon_T} \frac{\partial C_{s,i}}{\partial t}|_{\bar{z},t} = \frac{u_L C_i|_{z,t} - u_L C_i|_{z+\Delta z,t}}{\Delta z} - \frac{D_{L,i} \frac{\partial C_i}{\partial z}|_{z,t} - D_{L,i} \frac{\partial C_i}{\partial z}|_{z+\Delta z,t}}{\Delta z} \quad (84)$$

Na Equação 85, assume-se que  $u_L$  e  $D_{L,i}$  são constantes e  $\Delta z \rightarrow 0$ , assim, tem-se uma equação em que o primeiro termo da esquerda corresponde a fase móvel, o segundo, a fase estacionária, e os outros dois termos depois da igualdade correspondem, respectivamente, a difusão e a convecção. Na maioria dos casos apresentados na literatura, a razão da fase do empacotamento  $(1 - \varepsilon_T)/\varepsilon_T$  é substituída por uma constante  $F$ , (razão de fase) Equação 86.

$$\frac{\partial C_i}{\partial t} + \frac{(1-\varepsilon_T)}{\varepsilon_T} \frac{\partial C_{s,i}}{\partial t} = D_{L,i} \frac{\partial^2 C_i}{\partial z^2} - u_L \frac{\partial C_i}{\partial z}, \quad (85)$$

$$F = \frac{V_s}{V_m} = \frac{(1-\varepsilon_T)}{\varepsilon_T}, \quad (86)$$

em que,  $V_s$  e  $V_m$  são os volumes das fases estacionária e móvel. A Equação 85 é integrada no volume de controle finito e fornece as Equações 87, 88 e 89, sendo que  $A_V$  a área de secção transversal do volume.

$$\int \frac{\partial C_i}{\partial t} \partial V = -F \int \frac{\partial C_{s,i}}{\partial t} \partial V + D_{L,i} \int \frac{\partial^2 C_i}{\partial z^2} \partial V - u_L \int \frac{\partial C_i}{\partial z} \partial V, \quad (87)$$

$$\int \frac{\partial C_i}{\partial t} A_V \partial z = -F \int \frac{\partial C_{s,i}}{\partial t} A_V \partial z + D_{L,i} \int \frac{\partial^2 C_i}{\partial z^2} A_V \partial z - u_L \int \frac{\partial C_i}{\partial z} A_V \partial z, \quad (88)$$

$$A_V \frac{\partial C_i}{\partial t} \Delta z \Big|_z = -F A_V \frac{\partial C_{s,i}}{\partial t} \Delta z \Big|_z + D_{L,i} A_V \frac{\partial C_i}{\partial z} \Big|_{z-\Delta z/2}^{z+\Delta z/2} - u_L A_V C_i \Big|_{z-\Delta z/2}^{z+\Delta z/2}. \quad (89)$$

A Equação 89 é dividida por  $A_V \Delta z$  e neste caso considera que cada posição central do volume ou nó pertence à uma posição  $j$ . Assim, na Equação 90, é possível substituir os parâmetros e variáveis adimensionais, sendo estes para o tempo (Equação 92), posição (Equação 91), dispersão axial (Equação 93) e concentração da fase móvel (Equação 94).

$$\left. \frac{\partial C_i}{\partial t} \right|_j = -\frac{(1-\varepsilon_T)}{\varepsilon_T} \left. \frac{\partial C_{s,i}}{\partial t} \right|_j + \frac{D_{L,i}}{\Delta z} \left. \frac{\partial C_i}{\partial z} \right|_{j-1/2}^{j+1/2} - u_L \left. \frac{C_i}{\Delta z} \right|_{j-1/2}^{j+1/2}, \quad (90)$$

$$\chi = \frac{z}{L}, \quad (91)$$

$$\tau = \frac{u_L t}{L}, \quad (92)$$

$$Pe_{L,i} = \frac{u_L L}{D_{L,i}}, \quad (93)$$

$$\Gamma = \frac{c}{c_{ref}}, \quad (94)$$

no qual,  $\chi$  é o termo da posição,  $\tau$  tempo e  $\Gamma$  concentração, todos adimensionalizados e  $Pe_a$  é o número de Peclet para dispersão aparente. Diante disso, a Equação 95 é definida para cada volume  $j$ , sendo que o termo  $\left. \frac{\partial \Gamma}{\partial \chi} \right|_{j-1/2}^{j+1/2}$  e  $\left. \frac{\Gamma}{\Delta \chi} \right|_{j-1/2}^{j+1/2} = (\Gamma_{j+1/2} - \Gamma_{j-1/2})/\Delta \chi$  dependem das faces do volume (a partir do nó  $j$ ).

$$\begin{aligned} \left. \frac{\partial (\Gamma C_{ref})_i}{\partial \left( \frac{\tau L}{u_L} \right)} \right|_j &= -\frac{(1-\varepsilon_T)}{\varepsilon_T} \left. \frac{\partial (\Gamma C_{ref})_{s,i}}{\partial \left( \frac{\tau L}{u_L} \right)} \right|_j + \frac{\left( \frac{u_L L}{Pe_{L,i}} \right)_{L,i}}{\Delta(\chi L)} \left. \frac{\partial (\Gamma C_{ref})_i}{\partial(\chi L)} \right|_{j-1/2}^{j+1/2} - u_L \left. \frac{(\Gamma C_{ref})_i}{\Delta(\chi L)} \right|_{j-1/2}^{j+1/2}, \\ \frac{u_L C_{ref}}{L} \left. \frac{\partial \Gamma_i}{\partial \tau} \right|_j &= -\frac{(1-\varepsilon_T)}{\varepsilon_T} \frac{u_L C_{ref}}{L} \left. \frac{\partial \Gamma_{s,i}}{\partial \tau} \right|_j + \frac{\left( \frac{u_L C_{ref}}{Pe_{L,i}} \right)_{L,i}}{\Delta \chi} \left. \frac{\partial \Gamma_i}{\partial \chi} \right|_{j-1/2}^{j+1/2} - \frac{u_L C_{ref}}{L} \left. \frac{\Gamma_i}{\Delta \chi} \right|_{j-1/2}^{j+1/2}, \\ \frac{u_L C_{ref}}{L} \left. \frac{\partial \Gamma_i}{\partial \tau} \right|_j &= -\frac{(1-\varepsilon_T)}{\varepsilon_T} \frac{u_L C_{ref}}{L} \left. \frac{\partial \Gamma_{s,i}}{\partial \tau} \right|_j + \frac{u_L C_{ref}}{L} \frac{1}{Pe_{L,i} \Delta \chi} \left. \frac{\partial \Gamma_i}{\partial \chi} \right|_{j-1/2}^{j+1/2} - \frac{u_L C_{ref}}{L} \left. \frac{\Gamma_i}{\Delta \chi} \right|_{j-1/2}^{j+1/2}, \\ \left. \frac{\partial \Gamma_i}{\partial \tau} \right|_j &= -\frac{(1-\varepsilon_T)}{\varepsilon_T} \left. \frac{\partial \Gamma_{s,i}}{\partial \tau} \right|_j + \frac{1}{Pe_{L,i} \Delta \chi} \left. \frac{\partial \Gamma_i}{\partial \chi} \right|_{j-1/2}^{j+1/2} - \left. \frac{\Gamma_i}{\Delta \chi} \right|_{j-1/2}^{j+1/2}. \end{aligned} \quad (95)$$

Para a solução do problema os termos nas faces são aproximados para os nós, no qual o primeiro volume foi discretizados aplicando aproximação para frente, Equação 96, o último aproximação para trás, Equação 97 e os demais pelos nós centrais, Equação 98.

$$\left. \frac{\partial \Gamma_i}{\partial \chi} \right|_{j-1/2}^{j+1/2} = \left. \frac{\partial \Gamma_i}{\partial \chi} \right|_{j+1/2} = \frac{\Gamma_{i,j+1} - \Gamma_{i,j}}{\Delta \chi}; \quad j = 1 \quad (96)$$

$$\left. \frac{\partial \Gamma_i}{\partial \chi} \right|_{j-1/2}^{j+1/2} = \left. \frac{\partial \Gamma_i}{\partial \chi} \right|_{j-1/2} = \frac{\Gamma_{i,j-1} - \Gamma_{i,j}}{\Delta \chi}; \quad j = n \quad (97)$$

$$\left. \frac{\partial \Gamma_i}{\partial \chi} \right|_{j-1/2}^{j+1/2} = \frac{\Gamma_{i,j+1} - \Gamma_j}{\Delta \chi} - \frac{\Gamma_{i,j} - \Gamma_{i,j-1}}{\Delta \chi}; \quad j = 2, \dots, n-1 \quad (98)$$

Para resolver o termo  $(\Gamma_{i,j+1/2} - \Gamma_{i,j-1/2})/\Delta \chi$  nos nós, o interpoladores de faces são utilizados, para *Upwind*, Equações 99 e 100.

$$\Gamma_{i,j+1/2} = \Gamma_{i,j}, \quad (99)$$

$$\Gamma_{i,j-1/2} = \Gamma_{i,j-1}. \quad (100)$$

No primeiro volume, alimentação da coluna, o cálculo da face a esquerda muda para Equação 101.

$$\Gamma_{i,j-1/2} = \Gamma_{i,feed}; \quad j = 1 \quad (101)$$

Entre os métodos de discretização da face de alta ordem está o de interpolação  $\kappa$ , em que se aplica um polinômio de interpolação por partes, Equações 102 e 103. No primeiro nó,  $\Gamma_{i,j+1/2}$  é definido pela Equação 104 e  $\Gamma_{j-1/2} = \Gamma_{i,feed}$ .

$$\Gamma_{i,j+1/2} = \Gamma_{i,j} + \frac{1+\kappa}{4}(\Gamma_{i,j+1} - \Gamma_{i,j}) + \frac{1-\kappa}{4}(\Gamma_{i,j} - \Gamma_{i,j-1}), \quad (102)$$

$$\Gamma_{i,j-1/2} = \Gamma_{i,j-1} + \frac{1+\kappa}{4}(\Gamma_{i,j} - \Gamma_{i,j-1}) + \frac{1-\kappa}{4}(\Gamma_{i,j-1} - \Gamma_{i,j-2}), \quad (103)$$

no qual, se  $\kappa = -1$  ou  $1$  o método é considerado de segunda ordem, porém se  $\kappa \in (-1,1)$  ele é considerado *Upwind*.

$$\Gamma_{i,j+1/2} = \Gamma_{i,j} + \frac{1+\kappa}{4}(\Gamma_{i,j+1} - \Gamma_{i,j}) + \frac{1-\kappa}{4}(\Gamma_{i,j} - \Gamma_{i,feed}); \quad j = 1 \quad (104)$$

Já os métodos TVD podem ser de segunda ordem ou mais, Equações 105 e 106, sendo que  $\Gamma_{i,j+1/2}$  é representado pela Equação 107 e  $\Gamma_{i,j-1/2} = \Gamma_{i,feed}$  para  $j = 1$ . Na última face, o *Upwind* é praticado,  $\Gamma_{i,j+1/2} = \Gamma_{i,j}$  para  $j = n$ .

$$\Gamma_{i,j+1/2} = \Gamma_{i,j} + \frac{1}{2}\Phi(r_{i,j+1/2})(\Gamma_{i,j} - \Gamma_{i,j-1}), \quad (105)$$

$$\Gamma_{i,j-1/2} = \Gamma_{i,j-1} + \frac{1}{2}\Phi(r_{i,j-1/2})(\Gamma_{i,j-1} - \Gamma_{i,j-2}), \quad (106)$$

$$\Gamma_{i,j+1/2} = \Gamma_{i,j} + \frac{1}{2}\Phi(r_{i,j+1/2})(\Gamma_{i,j} - \Gamma_{i,feed}); \quad j = 1 \quad (107)$$

Para o primeiro nó  $j = 1$  o  $r_{i,j+1/2} = (r_{i,j+1} - r_{i,j})/(r_{i,j} - r_{i,feed})$  e para os demais ( $j = 2, \dots, n-1$ ) o  $r_{i,j+1/2} = (r_{i,j+1} - r_{i,j})/(r_{i,j} - r_{i,j-1})$ , já para  $j = n$  o  $r_{i,j-1/2} = (r_{i,j} - r_{i,j-1})/(r_{i,j-1} - r_{i,j-2})$ .

### B.1.2. Solução das equações diferenciais parciais por volumes finitos para os modelos cinéticos agrupados (LKM) e reativo-dispersivo de múltiplos componentes

As Equações 95 e 10 são empregadas para modelar o problema (solução das equações diferenciais parciais). A equação para múltiplos componentes pode ser representada pela Equação 108.

$$\frac{\partial C_{s,i}}{\partial t} = k_{a,i} q_{s,i} C_i \left( 1 - \sum_{k=1}^{Nc} \frac{C_{s,k}}{q_{s,k}} \right) - k_{d,i} C_{s,i}, \quad (108)$$

no qual,  $k_{a,i}$ ,  $k_{d,i}$  e  $q_{s,i}$  são os parâmetros de cada componente responsáveis pela adsorção, dessorção e concentração máxima de adsorção da coluna, respectivamente, e  $Nc$  corresponde ao número de componentes. Entretanto para aplicação do modelo responsável pela parte sólida (Equação 109), foi necessário substituir os parâmetros e variáveis adimensionais, sendo para o tempo (Equação 92) e concentração da fase móvel (Equação 94). Se  $q_s$  for único para coluna inteira, então as Equações 109 e 110 são responsáveis pelo balanço da coluna cromatográfica para cada componente e nó.

$$\left. \frac{\partial (\Gamma C_{ref})_{s,i}}{\partial \left( \frac{\tau L}{u_L} \right)} \right|_j = k_a q_s (\Gamma C_{ref})_i \left( 1 - \sum_{k=1}^{Nc} \frac{(\Gamma C_{ref})_{s,k}}{q_s} \right) - k_d (\Gamma C_{ref})_{s,i},$$

$$\frac{u_L C_{ref}}{L} \frac{\partial \Gamma_{s,i}}{\partial \tau} = C_{ref} k_a q_s \Gamma_i \left( 1 - C_{ref} \sum_{k=1}^{Nc} \frac{\Gamma_{s,k}}{q_s} \right) - C_{ref} k_d \Gamma_{s,i},$$

$$\left. \frac{\partial \Gamma_{s,i}}{\partial \tau} \right|_j = \frac{L C_{ref}}{C_{ref} u_L} \left[ k_a q_s \Gamma_{i,j} \left( 1 - C_{ref} \sum_{k=1}^{Nc} \frac{\Gamma_{s,k}}{q_s} \right) - k_d \Gamma_{s,i} \right],$$

$$\left. \frac{\partial \Gamma_{s,i}}{\partial \tau} \right|_j = \frac{L}{u_L} \left[ k_a q_s \Gamma_{i,j} \left( 1 - C_{ref} \sum_{k=1}^{Nc} \frac{\Gamma_{s,kj}}{q_s} \right) - k_d \Gamma_{s,i,j} \right], \quad (109)$$

$$\left. \frac{\partial \Gamma_i}{\partial \tau} \right|_j = -\frac{(1-\varepsilon_T)}{\varepsilon_T} \frac{\partial \Gamma_{s,i}}{\partial \tau} + \frac{1}{Pe_{L,i} \Delta \chi} \left. \frac{\partial \Gamma_i}{\partial \chi} \right|_{j-1/2}^{j+1/2} - \frac{\Gamma_i}{4\chi} \left. \right|_{j-1/2}^{j+1/2}. \quad (110)$$

Para a solução do problema os termos nas faces são aproximados para os nós, Equações 96 a 98. E os interpoladores de faces (Equações 99 a 107), sendo eles *Upwind*, interpolação  $\kappa$  ou TVD.

#### B.1.2.1 Modelo do modulador de fase móvel (MPM) para o modelo reativo-dispersivo de múltiplos componentes.

Quando se adiciona na fase móvel uma concentração de solvente ou sal, como no caso da cromatografia hidrofóbica e de troca iônica, a retenção do componente  $i$

geralmente altera. As interações de adsorção (Equação 111) e a dessorção (Equação 112) são melhores compreendidas na seção 2.5.2

$$k_{a,i} = k_{a0,i}e^{\gamma_i\phi}, \quad (111)$$

$$k_{d,i} = k_{d0,i}\phi^{\beta_i}, \quad (112)$$

Na Equação 113, o modelo reativo-dispersivo (Equação 109) acoplado a teoria do modulador de fase móvel para interações hidrofóbica (Equação 111) e eletrostáticas (Equação 112).

$$\frac{\partial \Gamma_{s,i}}{\partial \tau} = \frac{L}{u_L} \left[ k_{a0,i}e^{\gamma_i\phi} q_s \Gamma_i \left( 1 - C_{ref} \sum_{k=1}^{Nc} \frac{\Gamma_{s,k}}{q_s} \right) - k_{d0,i}\phi^{\beta_i} \Gamma_{s,i} \right], \quad (113)$$

em que,  $k_{a0}$  e  $k_{d0}$  são as constantes de adsorção e dessorção, respectivamente, quando na fase móvel só estiver presente a solução tampão, ou seja, estes são constantes para concentração de modulador ( $\phi$ ) igual a zero. Os termos de interação hidrofóbica ( $\gamma$ ), iônica ( $\beta$ ), e a concentração de saturação ( $q_s$ ) são constantes, os demais, alteram com o tempo, posição e com o componente.

### B.1.2.2 Steric Mass-Action (SMA) para o modelo reativo-dispersivo de múltiplos componentes.

Um dos modelos de equilíbrio de associação mais utilizados é o SMA (Equação 14), este modelo e as concentrações de sal na fase estacionária ( $\phi_s$ , Equação 15) e de contra-íons disponíveis ( $\bar{\phi}_s$ , Equação 16) são adimensionalizados, o tempo (Equação 92), concentrações da fase móvel (Equação 94), de sal na fase estacionária (Equação 114) e de sal na fase móvel (Equação 115). Como resultado tem-se os termos de concentrações de contra-íons disponíveis (Equação 116) e o balanço de massa da fase estacionária (Equação 117).

$$\hat{\phi}_s = \frac{\bar{\phi}_s}{C_{ref}}, \quad (114)$$

$$\hat{\phi} = \frac{\phi}{C_{ref}}, \quad (115)$$

$$\hat{\phi}_s C_{ref} = \Lambda - \sum_{i=1}^{Nc} (v_i + \sigma_i) (C_{ref} \Gamma)_{s,i},$$

$$\hat{\phi}_s = \Lambda / C_{ref} - \sum_{i=1}^{Nc} (v_i + \sigma_i) \Gamma_{s,i}, \quad (116)$$

$$\frac{\partial (C_{ref} \Gamma)_{s,i}}{\partial \left( \frac{Lx}{u_L} \right)} = k_{a,i} (C_{ref} \Gamma)_i (\hat{\phi}_s C_{ref})^{v_i} - k_{d,i} (C_{ref} \Gamma)_{s,i} (\hat{\phi} C_{ref})^{v_i},$$

$$\frac{u_L C_{ref}}{L} \frac{\partial \Gamma_{s,i}}{\partial \tau} = C_{ref} [C_{ref}^{v_i} k_{a,i} \hat{\phi}_s^{v_i} \Gamma_i - C_{ref}^{v_i} k_{d,i} \hat{\phi}^{v_i} \Gamma_{s,i}],$$

$$\frac{\partial \Gamma_s}{\partial \tau} = \frac{L C_{ref}^{v_i}}{u_L} [k_{a,i} \hat{\phi}_s^{v_i} \Gamma_i - k_{d,i} \hat{\phi}^{v_i} \Gamma_{s,i}], \quad (117)$$

em que, carga iônica ( $v_i$ ), a capacidade de impedimento estérico ( $\sigma_i$ ) e os coeficientes de adsorção ( $k_{a,i}$ ) e dessorção ( $k_{d,i}$ ) são constantes dependentes de cada molécula e a capacidade iônica ( $\Lambda$ ) refere-se a coluna (parâmetros da parte cinética do LKM),  $C_{ref}$  é uma constante global de adimensionalização e os demais ( $\Gamma_i$  e  $\Gamma_{s,i}$ ) são variáveis de concentração dependente do tempo ( $\tau$ ), posição e componente (i).

### B.1.3. Solução das equações diferenciais parciais por volumes finitos para os modelos cinéticos agrupados (LKM) e reativo-dispersivo de um único componente

As Equações 95 e 10 são empregadas para modelar o problema (solução das equações diferenciais parciais). A equação algébrica para um componente pode ser representada pela Equação 118.

$$\frac{\partial C_s}{\partial \tau} = k_a (q_s - C_s) C - k_d C_s, \quad (118)$$

no qual,  $k_a$ ,  $k_d$  e  $q_s$  são os parâmetros responsáveis pela adsorção, dessorção e concentração máxima de adsorção da coluna, respectivamente. Entretanto para aplicação da equação algébrica, responsável pela parte sólida (Equação 118), foi necessário substituir os parâmetros e variáveis adimensionais, sendo para o tempo (Equação 92) e concentração da fase móvel (Equação 94). Se  $q_s$  for único para coluna inteira, então as Equações 119 e 120 são responsáveis pelo balanço da coluna cromatográfica para cada componente e nó.

$$\frac{\partial (\Gamma C_{ref})_s}{\partial \left( \frac{\tau L}{u_L} \right)} = k_a \left( q_s - (\Gamma C_{ref})_s \right) \Gamma C_{ref} - k_d (\Gamma C_{ref})_s,$$

$$\frac{u_L C_{ref}}{L} \frac{\partial \Gamma_s}{\partial \tau} = k_a C_{ref} (q_s - C_{ref} \Gamma_s) \Gamma - C_{ref} k_d \Gamma_s,$$

$$\frac{\partial \Gamma_s}{\partial \tau} = \frac{L}{C_{ref} u_L} [k_a C_{ref} (q_s - C_{ref} \Gamma_s) \Gamma - C_{ref} k_d \Gamma_s],$$

$$\frac{\partial \Gamma_s}{\partial \tau} = \frac{L}{u_L} [k_a (q_s - C_{ref} \Gamma_s) \Gamma - k_d \Gamma_s] \quad (119)$$

$$\left. \frac{\partial \Gamma}{\partial \tau} \right|_j = -\frac{(1-\varepsilon_T)}{\varepsilon_T} \frac{\partial \Gamma_s}{\partial t} + \frac{1}{Pe_L \Delta \chi} \left. \frac{\partial \Gamma}{\partial \chi} \right|_{j-1/2}^{j+1/2} - \frac{\Gamma_{j+1/2} - \Gamma_{j-1/2}}{\Delta \chi} \quad (120)$$

Para a solução do problema os termos nas faces são aproximados para os nós, Equações 96 a 98. E os interpoladores de faces (Equações 99 a 107), sendo eles Upwind, interpolação  $\kappa$  ou TVD. Os modelos MPM e SMA (seções “B.1.2.1 Modelo do modulador de fase móvel (MPM) para o modelo reativo-dispersivo de múltiplos componentes.” “B.1.2.2 Steric Mass-Action (SMA) para o modelo reativo-dispersivo de múltiplos componentes.”) também foram implementados para solução do problema com um único componente, para SMA Equações 121 e 122 e para MPM Equação 123.

$$\hat{\phi}_s = \Lambda / C_{ref} - (\nu + \sigma) \Gamma_s, \quad (121)$$

$$\frac{\partial \Gamma_s}{\partial \tau} = \frac{L C_{ref}}{u_L} [k_a \hat{\phi}_s^\nu \Gamma - k_d \hat{\phi}_s^\nu \Gamma_s], \quad (122)$$

$$\frac{\partial \Gamma_s}{\partial \tau} = \frac{L}{u_L} [k_{a0} e^{\gamma \phi} q_s \Gamma (1 - C_{ref} \frac{\Gamma_s}{q_s}) - k_{d0} \phi^\beta \Gamma_s], \quad (123)$$

em que, para o modelo SMA a carga iônica ( $\nu$ ), a capacidade de impedimento estérico ( $\sigma$ ) e os coeficientes de adsorção ( $k_a$ ) e dessorção ( $k_d$ ) são constantes e a capacidade iônica ( $\Lambda$ ) refere-se a coluna (parâmetros da parte cinética do LKM),  $C_{ref}$  é uma constante global de adimensionalização e os demais ( $\Gamma$  e  $\Gamma_s$ ) são variáveis da concentração de um único componente que depende do tempo ( $\tau$ ) e da posição. Para o MPM,  $k_{a0}$  e  $k_{d0}$  são as constantes de adsorção e dessorção, respectivamente, quando na fase móvel só estiver presente a solução tampão, ou seja, estes são constantes para concentração de modulador ( $\phi$ ) igual a zero. Os termos de interação hidrofóbica ( $\gamma$ ), iônica ( $\beta$ ), e a concentração de saturação ( $q_s$ ) são constantes, os demais, alteram com o tempo e com a posição.

#### **B.1.4. Solução das equações diferenciais parciais por volumes finitos para o modelo equilíbrio dispersivo (EDM) de múltiplos componentes acoplado ao modelo LSS**

Se ao invés da dispersão axial  $D_{L,i}$  (Equação 85) for utilizado uma dispersão aparente  $D_{a,i}$  e considerando que a concentração da fase estacionária  $C_{s,i}$  esteja em equilíbrio com a fase móvel  $C_i$ , a equação de balanço pode ser rearranjada para a Equação 124 (EDM).

$$\frac{\partial C_i}{\partial t} + F \frac{\partial q_i}{\partial t} = D_{a,i} \frac{\partial^2 C_i}{\partial z^2} - u_L \frac{\partial C_i}{\partial z} \quad (124)$$

Para o modelo multicomponente a  $\partial q_i/\partial t$  da Equação 124 pode ser fragmentada em três novos termos, sendo eles o da variação da concentração de soluto retido em razão à da fase móvel ( $\partial q_i \partial C_i / \partial C_i \partial t$ ), somatória da variação da concentração de soluto retido em razão ao dos outros componentes ( $\sum_{k \neq i}^N \partial q_i \partial C_k / \partial C_k \partial t$ ) e também pela concentração do modulador de fase ( $\partial q_i \partial \phi / \partial \phi \partial t$ ), representada pela Equação 125.

$$\frac{\partial C_i}{\partial t} + \frac{(1-\varepsilon_T)}{\varepsilon_T} \left[ \frac{\partial q_i}{\partial C_i} \frac{\partial C_i}{\partial t} + \sum_{k \neq i}^N \frac{\partial q_i}{\partial C_k} \frac{\partial C_k}{\partial t} + \frac{\partial q_i}{\partial \phi} \frac{\partial \phi}{\partial t} \right] = D_a \frac{\partial^2 C_i}{\partial z^2} - u_L \frac{\partial C_i}{\partial z}, \quad (125)$$

no qual, o índice  $k$  significa os outros componentes da mistura. A Equação 125 foi integrada no volume de controle finito, como nas Equações 87-90, e como resultado tem-se a Equação 126.

$$\frac{\partial C_i}{\partial t} \Big|_j + \frac{(1-\varepsilon_T)}{\varepsilon_T} \left[ \frac{\partial q_i}{\partial C_i} \frac{\partial C_i}{\partial t} + \sum_{k \neq i}^N \frac{\partial q_i}{\partial C_k} \frac{\partial C_k}{\partial t} + \frac{\partial q_i}{\partial \phi} \frac{\partial \phi}{\partial t} \right] = \frac{D_{a,i}}{\Delta z} \frac{\partial C_i}{\partial z} \Big|_{j-1/2}^{j+1/2} - u_L \frac{C_i}{\Delta z} \Big|_{j-1/2}^{j+1/2}, \quad (126)$$

Substituiu-se os parâmetros e variáveis adimensionais, sendo para o tempo (Equação 92), posição (Equação 91), dispersão aparente (Equação 127) e concentração da fase móvel (Equação 94), assim, a Equação 128 corresponde as equações diferenciais parciais discretizado e adimensionalizado na concentração (fase móvel), dispersão, tempo e posição .

$$Pe_a = \frac{u_L L}{D_a}, \quad (127)$$

$$\frac{\partial \Gamma_i}{\partial \tau} \Big|_j + \frac{(1-\varepsilon_T)}{\varepsilon_T} \left[ \frac{\partial q_i}{\partial \Gamma_i} \frac{\partial \Gamma_i}{\partial \tau} + \sum_{k \neq i}^N \frac{\partial q_i}{\partial \Gamma_k} \frac{\partial \Gamma_k}{\partial \tau} + \frac{\partial q_i}{\partial \phi} \frac{\partial \phi}{\partial \tau} \right] \Big|_j = \frac{1}{Pe_{L,i} \Delta \chi} \frac{\partial \Gamma_i}{\partial \chi} \Big|_{j-1/2}^{j+1/2} - \frac{\Gamma_i}{\Delta \chi} \Big|_{j-1/2}^{j+1/2}, \quad (128)$$

A Equação 128 foi reestruturada (Equação 129), e os termos  $\partial q_i/\partial C_i$  (Equação 130),  $\sum_{k \neq i}^N \partial q_i/\partial C_k$  (Equação 132) e  $\partial q_i/\partial \phi$  (Equação 134), da Equação 125, foram adimensionalizados, para o tempo (Equação 92) e concentração da fase móvel (Equação 94), e representados pelas Equações 131, 133 e 135 , respectivamente.

$$\frac{\partial \Gamma_i}{\partial \tau} \Big|_j \left[ 1 + F \frac{\partial q_i}{\partial \Gamma_i} \right] + F \sum_{k \neq i}^N \frac{\partial q_i}{\partial \Gamma_k} \frac{\partial \Gamma_k}{\partial \tau} \Big|_j + F \frac{\partial q_i}{\partial \phi} \frac{\partial \phi}{\partial \tau} \Big|_j = \frac{1}{Pe_{L,i} \Delta \chi} \frac{\partial \Gamma_i}{\partial \chi} \Big|_{j-1/2}^{j+1/2} - \frac{\Gamma_i}{\Delta \chi} \Big|_{j-1/2}^{j+1/2}, \quad (129)$$

$$\frac{\partial q_i}{\partial C_i} = \frac{q_s b_i (\sum_{k=1}^N b_k C_k - b_i C_{i+1})}{(1 + \sum_{k=1}^N b_k C_k)^2}, \quad (130)$$

$$\frac{\partial q_i}{\partial \Gamma_i} = \frac{q_s b_i C_{ref} (\sum_{k=1}^N b_k \Gamma_k - b_i \Gamma_{i+1} / C_{ref})}{(1 + C_{ref} \sum_{k=1}^N b_k \Gamma_k)^2}, \quad (131)$$

$$\sum_{k \neq i}^N \frac{\partial q_i}{\partial C_k} = - \frac{b_i b_k q_s C_i}{(1 + \sum_{k=1}^N b_k C_k)^2}, \quad (132)$$

$$\sum_{k \neq i}^N \frac{\partial q_i}{\partial \Gamma_k} = - \frac{b_i b_k q_s C_{ref} \Gamma_i}{(1 + C_{ref} \sum_{k=1}^N b_k \Gamma_k)^2}, \quad (133)$$

$$\frac{\partial q_i}{\partial \phi} = \frac{q_s b_i C_i (-S_i - S_i \sum_{k=1}^N b_k C_k + \sum_{k=1}^N b_k C_k S_k)}{(1 + \sum_{k=1}^N b_k C_k)^2}, \quad (134)$$

$$\frac{\partial q_i}{\partial \phi} = \frac{q_s b_i C_{ref} \Gamma_i (-S_i - S_i C_{ref} \sum_{k=1}^N b_k \Gamma_k + C_{ref} \sum_{k=1}^N b_k \Gamma_k S_k)}{(1 + C_{ref} \sum_{k=1}^N b_k \Gamma_k)^2}, \quad (135)$$

Para a solução do problema, o conjunto de equações (Equação 129 de  $j = 1, \dots, n$ ) foi escrito representação matricial ( $Ax = B$ , sistema de equações lineares). Para uma melhor explicação, um exemplo de dois componentes (Equações 136 e 137) e três volumes de controle (nós), a representação matricial foi Equação 138. Os termos nas faces são aproximados para os nós, Equações 96 a 98. E os interpoladores de faces (Equações 99 a 107), sendo eles *Upwind*, interpolação  $\kappa$  ou TVD. O termo transiente (vetor  $x$  do sistema linear  $Ax = B$ , Equação 138) pôde ser resolvido por método de integração de equações diferenciais ordinárias em cada volume dada a condição inicial.

$$\frac{\partial \Gamma_1}{\partial \tau} \Big|_j \left[ 1 + F \frac{\partial q_1}{\partial \Gamma_1} \right] + F \frac{\partial q_1}{\partial \Gamma_2} \frac{\partial \Gamma_2}{\partial \tau} = \frac{1}{Pe_{L,1} \Delta \chi} \frac{\partial \Gamma_1}{\partial \chi} \Big|_{j-1/2}^{j+1/2} - \frac{\Gamma_1}{\Delta \chi} \Big|_{j-1/2}^{j+1/2} - F \frac{\partial q_1}{\partial \phi} \frac{\partial \phi}{\partial t}, \quad (136)$$

$$\frac{\partial \Gamma_2}{\partial \tau} \Big|_j \left[ 1 + F \frac{\partial q_2}{\partial \Gamma_2} \right] + F \frac{\partial q_2}{\partial \Gamma_1} \frac{\partial \Gamma_1}{\partial \tau} = \frac{1}{Pe_{L,2} \Delta \chi} \frac{\partial \Gamma_2}{\partial \chi} \Big|_{j-1/2}^{j+1/2} - \frac{\Gamma_2}{\Delta \chi} \Big|_{j-1/2}^{j+1/2} - F \frac{\partial q_2}{\partial \phi} \frac{\partial \phi}{\partial t}, \quad (137)$$

$$A = \begin{bmatrix} \left[ 1 + F \frac{\partial q_1}{\partial \Gamma_1} \right]_1 & 0 & 0 & F \frac{\partial q_1}{\partial \Gamma_2} \Big|_1 & 0 & 0 \\ 0 & \left[ 1 + F \frac{\partial q_1}{\partial \Gamma_1} \right]_2 & 0 & 0 & F \frac{\partial q_1}{\partial \Gamma_2} \Big|_2 & 0 \\ 0 & 0 & \left[ 1 + F \frac{\partial q_1}{\partial \Gamma_1} \right]_3 & 0 & 0 & F \frac{\partial q_1}{\partial \Gamma_2} \Big|_3 \\ F \frac{\partial q_2}{\partial \Gamma_1} \Big|_1 & 0 & 0 & \left[ 1 + F \frac{\partial q_2}{\partial \Gamma_2} \right]_1 & 0 & 0 \\ 0 & F \frac{\partial q_2}{\partial \Gamma_1} \Big|_2 & 0 & 0 & \left[ 1 + F \frac{\partial q_2}{\partial \Gamma_2} \right]_2 & 0 \\ 0 & 0 & F \frac{\partial q_2}{\partial \Gamma_1} \Big|_3 & 0 & 0 & \left[ 1 + F \frac{\partial q_2}{\partial \Gamma_2} \right]_3 \end{bmatrix},$$

$$A \begin{bmatrix} \left. \frac{\partial \Gamma_1}{\partial \tau} \right|_1 \\ \left. \frac{\partial \Gamma_1}{\partial \tau} \right|_2 \\ \left. \frac{\partial \Gamma_1}{\partial \tau} \right|_3 \\ \left. \frac{\partial \Gamma_2}{\partial \tau} \right|_1 \\ \left. \frac{\partial \Gamma_2}{\partial \tau} \right|_2 \\ \left. \frac{\partial \Gamma_2}{\partial \tau} \right|_3 \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \frac{1}{Pe_{L,1}\Delta\chi} \left. \frac{\partial \Gamma_1}{\partial \chi} \right|_{1-1/2}^{1+1/2} - \frac{\Gamma_1}{\Delta\chi} \left. \right|_{1-1/2}^{1+1/2} - F \left. \frac{\partial q_1}{\partial \phi} \frac{\partial \phi}{\partial t} \right|_1 \\ \frac{1}{Pe_{L,1}\Delta\chi} \left. \frac{\partial \Gamma_1}{\partial \chi} \right|_{2-1/2}^{2+1/2} - \frac{\Gamma_1}{\Delta\chi} \left. \right|_{2-1/2}^{2+1/2} - F \left. \frac{\partial q_1}{\partial \phi} \frac{\partial \phi}{\partial t} \right|_2 \\ \frac{1}{Pe_{L,1}\Delta\chi} \left. \frac{\partial \Gamma_1}{\partial \chi} \right|_{3-1/2}^{3+1/2} - \frac{\Gamma_1}{\Delta\chi} \left. \right|_{3-1/2}^{3+1/2} - F \left. \frac{\partial q_1}{\partial \phi} \frac{\partial \phi}{\partial t} \right|_3 \\ \frac{1}{Pe_{L,2}\Delta\chi} \left. \frac{\partial \Gamma_2}{\partial \chi} \right|_{1-1/2}^{1+1/2} - \frac{\Gamma_2}{\Delta\chi} \left. \right|_{1-1/2}^{1+1/2} - F \left. \frac{\partial q_2}{\partial \phi} \frac{\partial \phi}{\partial t} \right|_1 \\ \frac{1}{Pe_{L,2}\Delta\chi} \left. \frac{\partial \Gamma_2}{\partial \chi} \right|_{2-1/2}^{2+1/2} - \frac{\Gamma_2}{\Delta\chi} \left. \right|_{2-1/2}^{2+1/2} - F \left. \frac{\partial q_2}{\partial \phi} \frac{\partial \phi}{\partial t} \right|_2 \\ \frac{1}{Pe_{L,2}\Delta\chi} \left. \frac{\partial \Gamma_2}{\partial \chi} \right|_{3-1/2}^{3+1/2} - \frac{\Gamma_2}{\Delta\chi} \left. \right|_{3-1/2}^{3+1/2} - F \left. \frac{\partial q_2}{\partial \phi} \frac{\partial \phi}{\partial t} \right|_3 \end{bmatrix}. \quad (138)$$

Para eluição por gradiente, a retenção do componente  $i$  altera com o tempo de processo e neste caso a concentração da fase estacionária em equilíbrio com a fase móvel altera com a concentração do modulador de fase. Observe que o fator de retenção de cada componente ( $k_i$ ) do modelo LSS, Equação 1, é equivalente a  $F \partial q_i / \partial C_i$ , pressupondo o modelo de eficiência infinita (caso linear e IM), Equação 77. No qual, pela constante de Henry ( $a_i = q_s b_i$ ) é possível determinar a constante de equilíbrio  $b_i$  para isoterma linear (Equação 139).

$$k_i = F a_i = F q_s b_i, \quad (139)$$

em que,  $b_i$  é a constante de equilíbrio e  $q_s$  a constante responsável pela concentração máxima de soluto na coluna (constante de saturação). Basicamente, a constante de equilíbrio pode ser definida em função de um modelo exponencial  $b_i = b_{0,i} e^{-S_i \phi}$ , sendo  $b_{0,i}$  a constante de equilíbrio para concentrações baixas ou nulas de modulador,  $S_i$  da constante do modulador e  $\phi(t)$  para concentração do solvente. Entretanto, a isoterma linear não representa uma competitividade dos componentes entre si. Portanto, daqui em diante a Equação 131 (isoterma competitiva de adsorção de Langmuir) foi a única implementada para o modelo equilíbrio dispersivo multicomponente, e sempre quando tive uma concentração de solvente ( $\phi$ , modulador) na coluna o  $b_i = b_{0,i} e^{-S_i \phi}$  e  $b_k = b_{0,i} e^{-S_i \phi}$  são substituídos nas Equações 131, 133 e 135.

### B.1.5. Solução das equações diferenciais parciais por volumes finitos para o modelo equilíbrio dispersivo (EDM) de um único componente acoplado ao modelo LSS

A Equação 125 pode ser reestruturada para uma equação de um único componente (Equação 140), restando dois termos, sendo eles o da variação da concentração de soluto retido pela da fase móvel ( $\partial q \partial C / \partial C \partial t$ ) e também pela concentração do modulador de fase ( $\partial q \partial \phi / \partial \phi \partial t$ ), para isoterma de Langmuir acoplado ao modelo LSS (teorias discutidas no último tópico, Equação 139, e na seção “2.5.1 Modelo de força do solvente linear (LSS)”), tem-se Equações 141 e 142, respectivamente. Para isoterma linear o termo  $\partial q / \partial C$  pela Equação 143 e  $\partial q / \partial \phi$  através da Equação 144.

$$\frac{\partial C}{\partial t} + F \left[ \frac{\partial q}{\partial C} \frac{\partial C}{\partial t} + \frac{\partial q}{\partial \phi} \frac{\partial \phi}{\partial t} \right] = D_a \frac{\partial^2 C}{\partial z^2} - u_L \frac{\partial C}{\partial z} \quad (140)$$

$$\frac{\partial q}{\partial C} = q'(C) = \frac{q_s b_0 \exp^{-S\phi}}{(1 + b_0 \exp^{-S\phi C})^2}. \quad (141)$$

$$\frac{\partial q}{\partial \phi} = \frac{-q_s b_0 \exp^{-S\phi} C S}{(1 + b_0 \exp^{-S\phi C})^2}. \quad (142)$$

$$q' = q_s b_0 \exp^{-S\phi}, \quad (143)$$

$$\frac{\partial q}{\partial \phi} = -q_s b_0 \exp^{-S\phi} C S, \quad (144)$$

no qual a constante de equilíbrio para concentrações baixas ou nulas de modulador ( $b_0$ ), constante do modulador ( $S$ ) e concentração do solvente ( $\phi(t)$ ). A Equação 140 pode ser rearranja para Equação 145 de modo que o termo  $\partial C / \partial t$  esteja isolado. O termo transiente pôde ser resolvido por método de integração de equações diferenciais ordinárias em cada volume dada a condição inicial.

$$\frac{\partial C}{\partial t} [1 + F q'(C)] = D_a \frac{\partial^2 C}{\partial z^2} - u_L \frac{\partial C}{\partial z} - F \frac{\partial q}{\partial \phi} \frac{\partial \phi}{\partial t} \quad (145)$$

A Equação 145 é integrada no volume de controle finito e fornece as Equações 146, 147 e 148, sendo que  $E = [1 + F q'(C)]$  e  $A_V$  a área de secção transversal do volume.

$$E \int \frac{\partial C}{\partial t} \partial V = D_\alpha \int \frac{\partial^2 C}{\partial z^2} \partial V - u_L \int \frac{\partial C}{\partial z} \partial V - F \int \frac{\partial q}{\partial \phi} \frac{\partial \phi}{\partial t} \partial V, \quad (146)$$

$$E \int \frac{\partial C}{\partial t} A_V \partial z = D_\alpha \int \frac{\partial^2 C}{\partial z^2} A_V \partial z - u_L \int \frac{\partial C}{\partial z} A_V \partial z - F \int \frac{\partial q}{\partial \phi} \frac{\partial \phi}{\partial t} A_V \partial z, \quad (147)$$

$$EA_V \frac{\partial C}{\partial t} \Delta z \Big|_z = D_\alpha A_V \frac{\partial C}{\partial z} \Big|_{z-\Delta z/2}^{z+\Delta z/2} - u_L A_V C \Big|_{z-\Delta z/2}^{z+\Delta z/2} - F A_V \frac{\partial q}{\partial \phi} \frac{\partial \phi}{\partial t} \Delta z \Big|_z. \quad (148)$$

A Equação 148 é dividida por  $A_V \Delta z$  e neste caso considera que cada posição central do volume ou nó pertence à uma posição  $j$ . Assim, na Equação 149, substitui-se os parâmetros e variáveis adimensionais, sendo estes para o tempo (Equação 92), posição (Equação 91), dispersão aparente (Equação 93) e concentração da fase móvel (Equação 94).

$$[1 + Fq'(C)] \frac{\partial C}{\partial t} \Big|_j = \frac{D_\alpha}{\Delta z} \frac{\partial C}{\partial z} \Big|_{j-1/2}^{j+1/2} - u_L \frac{C}{\Delta z} \Big|_{j-1/2}^{j+1/2} - F \frac{\partial q}{\partial \phi} \frac{\partial \phi}{\partial t} \Big|_j, \quad (149)$$

no qual,  $\chi$  é o termo da posição,  $\tau$  tempo e  $\Gamma$  concentração, todos adimensionalizados e  $Pe_\alpha$  é o número de Peclet para dispersão aparente. Diante disso, a Equação 150 é definida para cada volume  $j$ , sendo que o termo  $\partial \Gamma / \partial \chi \Big|_{j-1/2}^{j+1/2}$  e  $\Gamma / \Delta \chi \Big|_{j-1/2}^{j+1/2} = (\Gamma_{j+1/2} - \Gamma_{j-1/2}) / \Delta \chi$  dependem das faces do volume (a partir do nó  $j$ ).

$$[1 + Fq'(\Gamma)] \frac{\partial \Gamma}{\partial \tau} \Big|_j = \frac{1}{Pe_\alpha \Delta \chi} \frac{\partial \Gamma}{\partial \chi} \Big|_{j-1/2}^{j+1/2} - \frac{\Gamma_{j+1/2} - \Gamma_{j-1/2}}{\Delta \chi} - F \frac{\partial q(\Gamma)}{\partial \phi} \frac{\partial \phi}{\partial \tau} \Big|_j \quad (150)$$

Os termos  $q'(\Gamma)$  (Equações e 141) e  $\partial q(\Gamma) / \partial \phi$  (Equações 142) são definidos pelas Equações e 151, isoterma linear, e para isoterma Langmuir pelas Equações 152 e 153.

$$\frac{\partial q(\Gamma)}{\partial \phi} = -q_s b_0 \exp^{-S\phi} \Gamma S, \quad (151)$$

$$q'(\Gamma) = \frac{\partial q}{\partial \Gamma} = \frac{q_s b_0 \exp^{-S\phi}}{(1 + b_0 \exp^{-S\phi} \Gamma C_{ref})^2}, \quad (152)$$

$$\frac{\partial q(\Gamma)}{\partial \phi} = \frac{-q_s b_0 \exp^{-S\phi} \Gamma S}{(1 + b_0 \exp^{-S\phi} \Gamma C_{ref})^2}. \quad (153)$$

Os termos nas faces são aproximados para os nós, como nas Equações 96 a 98, só que para somente um único componente. E os interpoladores de faces (Equações 99 a 107), sendo eles Upwind, interpolação  $\kappa$  ou TVD, também para monocomponente. Os termos transientes  $\partial \Gamma / \partial \tau$  (Equação 150) de cada nó foram resolvidos por método de integração de equações diferenciais ordinárias.

## B.2. Modelagem da concentração de solvente na coluna, adimensionalização.

A adimensionalização das Equações 59, 60 e 61, no tempo (Equação 92) e na posição (Equação 91), passam a ser Equação 154, 155 e 156, respectivamente.

$$\chi_1 = \frac{u_L L}{u_L L} (\tau - \tau_{G,inj}) = (\tau - \tau_{G,inj}), \quad (154)$$

$$\chi_2 = (\tau - \tau_{G,fin}), \quad (155)$$

$$\phi = \phi_{min} - \left( -\frac{\phi_{max} - \phi_{min}}{(\chi_1 L - \chi_2 L)} \right) (\chi_1 L - \chi L),$$

$$\phi = \phi_{min} - \frac{L}{L} \frac{\phi_{min} - \phi_{max}}{(\chi_1 - \chi_2)} (\chi_1 - \chi),$$

$$\phi = \phi_{min} - \frac{\phi_{min} - \phi_{max}}{(\chi_1 - \chi_2)} (\chi_1 - \chi). \quad (156)$$

