



Universidade Federal do Triângulo Mineiro
Instituto de Ciências Tecnológicas e Exatas
Programa de Mestrado Profissional em Inovação Tecnológica

Willian Cardoso Gonçalves da Rocha

**Purificação da Cefalosporina C por cromatografia de troca iônica em coluna
de leito fixo**

Uberaba

2014

Willian Cardoso Gonçalves da Rocha

Purificação da Cefalosporina C por cromatografia de troca iônica em coluna de leito
fixo

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado Profissional em Inovação Tecnológica da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de mestre.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ana Claudia Granato Malpass

Co-orientador: Prof. Dr. Marlei Barboza Passoto

Uberaba

2014

Dedicatória

Primeiramente a Deus, que na sua infinita bondade me deu forças para poder superar mais esse desafio em minha trajetória.

Aos meus pais, que sempre com muito amor me ensinaram a maior lição da vida que é ser um homem de caráter e estão comigo sempre.

Aos meus amigos, da “Galera do abadá”, André, Fernanda, Franco, Gustavo, Wilian, Anderson, André, Bruno, Naidel e Daniel, aos meus amigos de Uberaba, André, Solon, Johnny, Tiago, Rogério, Alexandre, Cadu e João, pela amizade, por compartilharem os momentos bons e ruins, pelo apoio e confiança.

Agradecimentos

Aos meus orientadores, professora Ana Claudia pela enorme compreensão, apoio, dedicação, motivação, ensinamentos e amizade demonstradas nos momentos mais críticos e ao longo de todo este período de trabalho. E ao professor Marlei pela oportunidade concedida, pelos ensinamentos, por confiar em mim para executar este projeto e pela amizade dedicada. Tenho certeza que, em breve, Deus lhe dará forças para superar essa batalha e o colocará em condições de estar conosco novamente.

Ao professor Geoffrey, pelo apoio ao emprestar seus equipamentos e ajuda na interpretação de dados do trabalho, à professora Mônica pelo apoio quando foi necessário e por participar com sugestões na qualificação. Ao professor Marcelo por também participar com sugestões na qualificação.

À Thaíla minha companheira de mestrado por me ajudar diversas vezes durante este trabalho e por compartilhar sua amizade comigo.

A toda equipe de funcionários do ICTE da UFTM pela ajuda prestada em vários momentos.

Ao pessoal da UFSCar, pelo auxílio em me emprestar materiais e realizar as análises de HPLC necessárias para a conclusão do trabalho.

Aos meus companheiros de trabalho do time de laboratório da FMC, pelos ensinamentos e amizade. Em especial ao Luis Borges pela oportunidade dada e confiança demonstrada.

“Mil cairão ao teu lado, e dez mil à tua direita, mas não chegará a ti.”

(Salmos 91:7, A Sagrada Bíblia.)

SUMÁRIO

RESUMO	I
ABSTRACT	II
LISTA DE ILUSTRAÇÕES	III
LISTA DE TABELAS	V
LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS	VI
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
2.1 CEFALOSPORINA C (CPC).....	4
a) Descoberta.....	4
b) Estrutura química.....	4
c) Mecanismos de atuação e inibição.....	5
d) Via metabólica biossintética.....	6
e) Produção.....	10
2.2 PROCESSO DE DOWNSTREAM: OPERAÇÕES UNITÁRIAS ENVOLVIDAS NO PROCESSO DE RECUPERAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE PRODUTOS ORIUNDOS DE BIOPROCESSOS.....	13
2.3 PROCESSO DE ADSORÇÃO.....	16
2.3.1 Mecanismos de separação.....	17
2.3.2 Propriedades dos adsorventes.....	19
2.3.3 Relações de equilíbrio no processo de adsorção.....	20
2.3.4 Modos de operação.....	24
2.3.5 Adsorção por troca iônica.....	28

2.3.6 Purificação da CPC através de processos de adsorção.....	30
3. MATERIAIS E METODOLOGIA.....	33
3.1 PREPARO DAS COLUNAS E CORRIDAS CROMATOGRÁFICAS.....	33
3.2 CÁLCULOS DOS PARÂMETROS DA COLUNA.....	37
3.3 CINÉTICA E ISOTERMA DE ADSORÇÃO.....	40
3.4 SEPARAÇÃO CPC E METIONINA.....	41
4. RESULTADOS.....	43
4.1 PERFIS DE ELUIÇÃO DA CPC.....	43
4.2 CURVAS DE RUPTURA DA CPC.....	48
4.3 CINÉTICA E ISOTERMA DE ADSORÇÃO.....	57
4.3.1 Cinética de adsorção da CPC na resina IRA410.....	57
4.3.2 Isoterma de adsorção da CPC na resina IRA410 a 30°C.....	59
4.4 SEPARAÇÃO CPC METIONINA.....	61
5. CONCLUSÕES.....	65
6. TRABALHOS FUTUROS.....	67
7. REFERÊNCIAS.....	68
ANEXO.....	72

RESUMO

Este trabalho foi desenvolvido com o objetivo de avaliar a viabilidade do processo de purificação do antibiótico Cefalosporina C (CPC) através da cromatografia de troca iônica em coluna usando como fase estacionária a resina de troca aniônica Amberlite IRA 410. Apesar do uso da cromatografia por troca iônica ser conhecida no processo de purificação da CPC, a maioria da literatura disponível encontra-se na forma de patentes, isso restringe o acesso ao conhecimento do processo como um todo. Para avaliar a viabilidade do uso da resina de troca aniônica amberlite IRA 410 no processo de purificação da CPC foram realizados experimentos usando uma coluna cromatográfica empacotada com a resina. Na primeira etapa estudou-se a interação da CPC com a resina. Estes experimentos mostraram que a resina é capaz de adsorver bem a CPC, com pico bem definido e perfil de adsorção e eluição similar nas concentrações estudadas. Foram obtidas também as curvas de ruptura da CPC, em três diferentes vazões. E através das mesmas alguns parâmetros que são importantes, como eficiência do uso do leito, eficiência de recuperação do produto e produtividade foram calculados. Os resultados mostraram que o processo em coluna tem eficiências de remoção de CPC acima de 90% para todas as vazões estudadas. Também foi estudado o processo de adsorção da CPC na resina através curva de cinética e da isoterma de adsorção a 30°C, mostrando que o processo atinge o equilíbrio rapidamente e para concentrações estudadas obteve-se dados que foram melhores ajustados ao modelo linear de isoterma. Por fim, testou-se a possibilidade de purificar um caldo simulado contendo a CPC e o aminoácido metionina, a estratégia usada para separação dos componentes foi satisfatória e foi possível promover a separação da CPC e a metionina nas condições estudadas.

Palavras-chave: Cefalosporinas, Cromatografia, Troca iônica.

ABSTRACT

This work was to evaluate the feasibility of the process of purification of the antibiotic cephalosporin C (CPC) by ion-exchange chromatography column as stationary phase using the anion exchange resin Amberlite IRA 410. Spite of the use of chromatography be known in ion exchange purification of the CPC process, most of the available literature is in the form of patents, that restricts access to the knowledge of the process as a whole. To evaluate the feasibility of using anion exchange resin Amberlite IRA 410 in the purification process of the CPC experiments were performed using a chromatographic column packed with the resin. In the first step we studied the interaction of CPC with the resin. These experiments showed that the resin is able to adsorb much CPC with well-defined peak and similar adsorption and elution profile at the concentrations studied. The breakthrough curves of CPC were also obtained at three different flow rates. And through some of the same parameters that are important, such as efficient use of the bed, recovery efficiency and product yield were calculated. The results showed that the process has column CPC removal efficiencies above 90% for all flow rates studied. The adsorption of CPC was studied using the resin kinetics and adsorption isotherm at 30°C curve showing the process rapidly reaches equilibrium concentrations studied and obtained data were best fitted to a linear isotherm model. Finally, we tested the possibility to purify a simulated broth containing the CPC and the amino acid methionine, the strategy used for the separation of components was satisfactory and it was possible to promote the separation of CPC and methionine under the conditions studied.

Keywords: Cephalosporins, Chromatography, Ion Exchange.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 - MOLÉCULA DA CEFALOSPORINA C (CPC).....	5
FIGURA 2 - PERFIL DE CONCENTRAÇÃO DE GLICOSE, CRESCIMENTO CELULAR E DE PRODUÇÃO DE CPC DURANTE UMA FERMENTAÇÃO EM BATELADA ALIMENTADA.....	7
FIGURA 3 - ROTA BIOSINTÉTICA DA CPC.....	8
FIGURA 4 - MECANISMOS CROMATOGRÁFICOS.....	18
FIGURA 5 - MODELOS DE ISOTERMAS COMUNS: LINEAR, FREUNDLICH E LANGMUIR.....	22
FIGURA 6 - PERFIS CINÉTICOS DA ADSORÇÃO DA CPC NA RESINA NEUTRA XAD2.....	23
FIGURA 7 - PERFIS DE CONCENTRAÇÃO DO ADSORBATO NA COLUNA.....	26
FIGURA 8 - ESQUEMA DE MONTAGEM DE COLUNA CROMATOGRÁFICA.....	27
FIGURA 9 - MECANISMO DE TROCA IÔNICA.....	29
FIGURA 10 - COLUNAS USADAS NO PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	33
FIGURA 11 - ESPECTRO DE ABSORBÂNCIA DA CPC NA REGIÃO DO ULTRAVIOLETA.....	35
FIGURA 12 - ARRANJO EXPERIMENTAL COM CONTROLE DE TEMPERATURA E VAZÃO.....	36
FIGURA 13 - REPRESENTAÇÃO DA CURVA DE RUPTURA COM A DIVISÃO EM ÁREAS.....	39
FIGURA 14 – COMPARATIVO DOS CROMATOGRAMAS DA CPC NAS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES ESTUDADAS.....	45
FIGURA 15 - PERFIL DE ELUIÇÃO DA CPC APÓS TENTATIVA DE OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO.....	47
FIGURA 16 – COMPARATIVO DAS CURVAS DE RUPTURA DA CPC NAS VAZÕES DE 2,8, 4,0 E 5,3 mL.min⁻¹.....	49
FIGURA 17 – COMPARATIVO DAS CURVAS DE RUPTURA COM CONTROLE DE TEMPERATURA E VAZÃO.....	53

FIGURA 18 – CINÉTICA DE ADSORÇÃO DA CPC NA RESINA IRA410 A 30°C...	57
FIGURA 19 – AJUSTE DA CINÉTICA DE ADSORÇÃO DA CPC NA RESINA IRA410 AOS MODELOS DE REAÇÃO DE PRIMEIRA E SEGUNDA ORDEM.....	58
FIGURA 20 – ISOTERMA DE ADSORÇÃO DA CPC NA RESINA IRA410 A TEMPERATURA DE 30°C.....	60
FIGURA 21 – CROMATOGRAMA OBTIDO DA SEPARAÇÃO ENTRE CPC E METIONINA.....	62
FIGURA 22 – ESTADOS DA MOLÉCULA DA METIONINA DE ACORDO COM SEU pK.....	63

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - EXEMPLOS DE CEFALOSPORINAS SEMISSINTÉTICAS.....	5
TABELA 2 - PRINCIPAIS OPERAÇÕES UNITÁRIAS ENVOLVIDAS EM CADA ETAPA DO PROCESSO DE DOWNSTREAM.....	15
TABELA 3 - PRINCIPAIS MATERIAIS USADOS COMO ADSORVENTES EM PROCESSOS DE ADSORÇÃO.....	19
TABELA 4 - CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS USADAS PARA OBTENÇÃO DAS CURVAS DE RUPTURA DA CPC EM COLUNA EMPACOTADA COM A RESINA IRA 410 EXP. 1, 2, 3.....	35
TABELA 5 - CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS USADAS PARA OBTENÇÃO DAS CURVAS DE RUPTURA DA CPC EM COLUNA EMPACOTADA COM A RESINA IRA 410 EXP. 4, 5, 6.....	36
TABELA 6 - PARÂMETROS EXPERIMENTAIS PARA OTIMIZAÇÃO DA ELUIÇÃO DA CPC.....	37
TABELA 7 - CONDIÇÕES USADAS PARA A OBTENÇÃO DAS CURVAS DE RUPTURA COM CONTROLE DE VAZÃO E TEMPERATURA.....	37
TABELA 8 - PARÂMETROS DA COLUNA NAS TRÊS VAZÕES ESTUDADAS.....	50
TABELA 9 - PARÂMETROS DA COLUNA PARA OS EXPERIMENTOS REALIZADOS COM CONTROLE DE TEMPERATURA E VAZÃO.....	55

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

CPC - Cefalosporina C

Cef C - Cefamicina C

DAC - Deacetilcefalosporina C

DAOC - Deacetoxicefalosporina C

C_0 - Concentração inicial

C - Concentração na saída da coluna

C_f^* - Concentração final na fase líquida

q^* - Concentração final na fase sólida

t - tempo

t_b - Tempo de ruptura

t_u - Capacidade usada do leito

t_t - Tempo total

t_e - Capacidade estequiométrica do leito

ϵ_f - Eficiência de uso do leito

ϵ_r - Eficiência de remoção do soluto

P - Produtividade da coluna

A_1 - Área referente à região de uso eficiente do leito da curva de ruptura

A_2 - Área referente à região de capacidade do leito da curva ruptura

A_3 - Área referente à região de uso ineficiente do leito da curva de ruptura

K - Constante dos modelos de isotermas

R^2 - Coeficiente de correlação do ajuste dos dados

1. INTRODUÇÃO

A descoberta dos antibióticos β -lactâmicos se deu por acaso em 1929, quando A. Flemming notou que o crescimento de colônias bacterianas havia sido inibido por alguma contaminação presente no meio de cultura. Sua investigação levou-o a descobrir que sua cultura havia sofrido uma contaminação pelo fungo *Penicillium chrysogenum*. A substância responsável pela inibição do crescimento das colônias bacterianas produzida pelo fungo foi descoberta, caracterizada e recebeu o nome de penicilina (MUNIZ *et al*, 2007).

O sucesso da penicilina para fins terapêuticos alavancou a indústria de produtos biotecnológicos. Esse sucesso também fez com que surgissem novas linhas de pesquisa, tanto no desenvolvimento de novas moléculas quanto também no melhoramento de processos produtivos e de purificação de compostos antimicrobianos.

Em 1945 uma nova classe de β -lactâmicos foi descoberta por G. Brotzu ao pesquisar sobre a febre tifoide na Itália. Após alguns anos, essa nova classe foi caracterizada e nomeada como cefalosporinas (MUNIZ *et al*, 2007). O mecanismo de atuação das cefalosporinas é semelhante ao das penicilinas inibindo a síntese da parede celular das bactérias, porém é mais resistente às β -lactamases bacterianas. Seu amplo espectro de ação possibilita o combate a patógenos Gram-positivos e Gram-negativos (PAGE e LAWS, 2000).

Além das penicilinas e cefalosporinas, existem também os carbafens, as clavamas e as monobactanas. Todas essas classes de compostos β -lactâmicos tem em comum a presença do anel β -lactâmico que é diretamente responsável pela atividade antimicrobiana. As diferenças entre as classes se baseiam no segundo anel ligado ao anel β -lactâmico, e na posição onde são inseridos alguns ligantes (DEMAIN e ELANDER, 1999).

Os compostos β -lactâmicos respondem por uma importante fatia do mercado de antimicrobianos. No ano de 2009 as vendas das cefalosporinas atingiram um total de US\$ 11,9 bilhões, representando 28% do total de antibióticos vendidos no mundo todo, o maior percentual dentre todas as classes de β -lactâmicos (HAMAD, 2010). Os grandes valores econômicos aliados aos bons resultados terapêuticos demonstram a importância desses compostos, e dessa forma, o interesse no desenvolvimento de novas moléculas e também o

melhoramento dos processos produtivos e de purificação se tornaram áreas de extensa investigação.

A literatura existente referente aos compostos β -lactâmicos é extensa e nota-se também a existência de diversas patentes ligadas à produção e purificação destes compostos. Dentro do grupo das cefalosporinas, a cefalosporina C (CPC) se destaca, apesar de não ser usada diretamente como medicamento, é precursora de diversas cefalosporinas semissintéticas, excelentes antimicrobianos de amplo espectro contra patógenos Gram-negativos (DEMAIN e ELANDER, 1999).

A produção da CPC é realizada via fermentação submersa pelos fungos *Cephalosporium acremonium* e *Acremonium chrisogenum*. Devido à complexidade do caldo fermentativo, de onde se extrai o antibiótico, são necessárias diversas etapas de purificação, sendo que as mesmas são responsáveis por cerca de 50% do custo total de produção do antibiótico. Dentre as operações envolvidas no processo de recuperação da CPC, podem ser citadas: Moagem para o rompimento das células, centrifugação, filtração em diversas escalas, purificação de baixa resolução por extração e ultrafiltração, e purificação de alta resolução normalmente realizada por cromatografia (ELANDER, 2003).

As etapas de purificação da CPC devem proporcionar alta pureza do produto recuperado, devido à finalidade de uso que é produzir fármacos. Dessa forma, a técnica mais comumente usada para atingir esse objetivo é a cromatografia de adsorção em colunas de leito fixo. Na literatura encontram-se diversos estudos a cerca da purificação da CPC usando cromatografia por adsorção com resinas neutras. Através desta técnica é possível obter a molécula com alto grau de pureza, porém, a capacidade de adsorção dessas resinas é baixa (BARBOZA, ALMEIDA e HOKKA, 2003). Esse fato motiva a investigação de alternativas para se purificar o caldo fermentativo de produção da CPC.

A técnica de cromatografia por troca-iônica apresenta-se como uma possibilidade para purificar a CPC, haja vista o emprego desta técnica na purificação de outros antibióticos β -lactâmicos como a cefamicina C (OLIVEIRA *et al*, 2011) e o ácido clavulânico (BARBOZA, HOKKA e MAUGERI, 2002). Apesar desta técnica já ter sido investigada na purificação de outros antibióticos, na literatura pouco se encontra sobre a aplicação da mesma na purificação da CPC. Encontram-se apenas patentes a cerca do tema (Mc CORNICK e MACK, 1969; VOSER, 1973).

O objetivo principal do presente trabalho foi verificar a viabilidade do uso da técnica de cromatografia de troca iônica no processo de purificação da CPC empregando-se a resina amberlite IRA410 de troca aniônica como recheio da coluna.

Os objetivos específicos foram: Obter o perfil de eluição da CPC após a passagem da mesma através de uma coluna recheada com a resina. Obter as curvas de ruptura da CPC na coluna e os parâmetros operacionais do sistema. E por último, promover a separação da CPC do aminoácido metionina tido como contaminante a partir de um caldo simulado contendo a CPC e o aminoácido.

Primeiramente estudou-se a interação da resina com uma solução contendo apenas a CPC. Esta etapa foi abordada de duas formas. Na primeira foram realizados experimentos que permitissem a obtenção do perfil de adsorção e dessorção da CPC na resina IRA 410 usando solução de NaCl 4,0% m/V na etapa de eluição. Os resultados mostraram que a resina é capaz de adsorver a CPC em diferentes concentrações e a solução de NaCl consegue deslocar a CPC da resina fazendo com que ela seja eluída da coluna. Na segunda etapa foram obtidas as curvas de ruptura da CPC na coluna em diferentes vazões. Através da curva de ruptura é possível obter parâmetros importantes, como a eficiência de uso do leito e a produtividade do processo. Por fim, testou-se a tentativa de separação da mistura de CPC com o aminoácido metionina, presente no caldo fermentado e tido como contaminante.

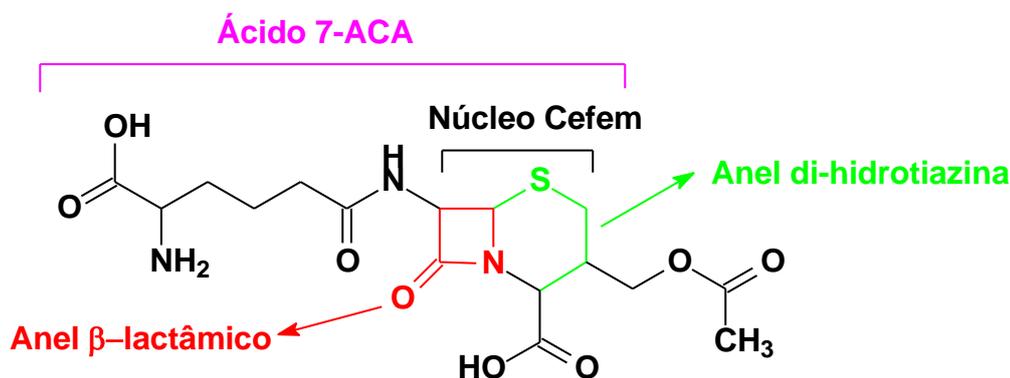
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 CEFALOSPORINA C (CPC):

A) Descoberta: A cefalosporina C (CPC) pertence à classe das Cefalosporinas e leva essa nomenclatura pelo fato de ter sido a primeira molécula deste grupo a ser descoberta. Esse composto foi descoberto em 1945, quando o Professor G. Brotzu investigava casos de febre tifoide na ilha da Sardenha, durante suas observações ele notou que um grupo de pessoas que se banhava em águas residuais não contraía a doença. Seus estudos mostraram que a água continha o fungo *Cephalosporium acremonium*, e que o mesmo era capaz de produzir uma substância que inibia o crescimento da *Salmonella typhii*, bactéria que causa a febre tifoide. Brotzu então enviou amostras desse fungo para Newton e Abraham em Oxford. Em 1955, esses pesquisadores descobriram que essa cepa produzia uma substância capaz de inibir o crescimento de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, além de ser estável em pH ácido e também resistente às β -lactamases bacterianas. Essa substância foi isolada, caracterizada e nomeada como Cefalosporina C (CPC) (MUNIZ *et al*, 2007; DEMAIN e ELANDER, 1999).

B) Estrutura Química: As cefalosporinas apresentam como característica marcante a presença de uma parte da molécula formada pelo anel β -lactâmico ligado a outro anel de 6 membros denominado de di-hidrotiazina. Esse núcleo bicíclico é denominado núcleo Cefem e esse núcleo é comum a todas as classes de cefalosporinas. No caso da CPC o esqueleto principal da molécula é constituído pelo ácido 7-aminocefalosporânico (7-ACA), composto pelo núcleo cefem mais a cadeia lateral D- α -ácido aminoadípico, todos esses grupos podem ser observados na figura 1.

Figura 1 - A molécula da cefalosporina C, em detalhe as principais regiões da molécula.



Fonte: O AUTOR, 2014 (Desenho no programa ChemWindow).

C) Mecanismos de atuação e inibição: A CPC não é um antibiótico potente quando usado diretamente, e por isso, não é comercializada para fins terapêuticos, seu uso principal é como precursor de cefalosporinas semissintéticas, que são antibióticos mais potentes e de amplo espectro, capazes de combater patógenos gram-positivos e negativos, além de apresentarem maior resistência às β -lactamases bacterianas. As cefalosporinas semissintéticas são produzidas a partir de modificações estruturais na molécula da CPC e são classificadas em gerações, de acordo com seu espectro de ação e sua resistência às β -lactamases (ELANDER, 2003). Na tabela 1 são citadas algumas moléculas e suas respectivas gerações.

Tabela 1 - Exemplos de Cefalosporinas semissintéticas.

Geração	Cefalosporinas semissintéticas
1ª Geração	Cefalotin, cefradina, cefadroxila, cefazolin, cefalexina.
2ª Geração	Cefuroxina, cefaclor, cefotetam, cefmetazola, cefonicida.
3ª Geração	Cefixima, ceftibutena, cefizoxima, ceftriaxona, cefamandol Cefoperazona, cefotaxima, proxetil, Cefprozil, ceftazidima, cefuroxima, cefpodexima.
4ª Geração	Cefepima.

Fonte: (Adaptado de ELANDER, 2003).

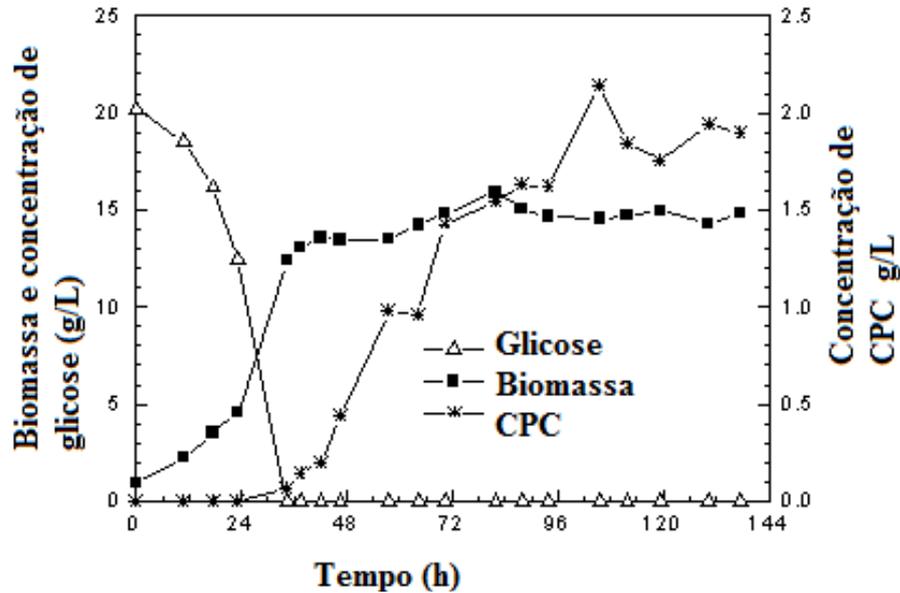
Existem diversas classes de antibióticos β -lactâmicos, como as penicilinas, as cefalosporinas, as clavamas e os carbapenens. Esses antibióticos apresentam mecanismo de atuação semelhante, atuando na inibição das enzimas transpeptidases bacterianas, responsáveis pela catálise da reação de formação das

ligações cruzadas da parede celular. O efeito da inibição dessa reação gera uma parede celular fraca e de fácil rompimento. A ação antibacteriana dos compostos β -lactâmicos está intimamente ligada ao anel β -lactâmico. A reação se baseia na acilação de sítios nucleofílicos da enzima, modificando seu sítio ativo e fazendo com que a mesma perca sua atividade (PAGE e LAWS, 2000). A inibição da atividade dos compostos β -lactâmicos é realizada pela enzima bacteriana β -lactamase, essa enzima cliva o anel β -lactâmico e gera como produto um composto sem atividade antibacteriana (FISHER, MEROUEH e MOBASHERY, 2005).

D) Via metabólica biossintética: Segundo Demain, a molécula da CPC é resultado do metabolismo secundário do microrganismo (DEMAIN, 1971). Inicialmente, durante a fase de crescimento ou *fase log*, o fungo realiza o metabolismo primário, sintetizando as proteínas, carboidratos e outras moléculas que darão origem às organelas necessárias para sobrevivência e reprodução. A CPC começa a ser observada no meio quando termina a fase de crescimento do fungo e o mesmo entra na idiofase ou *fase lag*. Nessa fase observa-se pouco aumento de biomassa do microrganismo e aumento da concentração de antibiótico no meio, fruto de reações do metabolismo secundário (CALAM, 1987). Este comportamento descrito pode ser observado na figura 2, que mostra os perfis de quantidade de biomassa, de concentração de glicose para alimentação e de concentração de CPC durante um processo de fermentação.

O metabolismo secundário é composto de reações paralelas às que estão dedicadas a suprir as necessidades essenciais do organismo e, aparentemente, não tem importância direta para o crescimento e reprodução dos mesmos, porém, seus metabólitos se mostram importantes para os mecanismos de defesa da célula (CUNHA, 1975). E mesmo desempenhando funções bem distintas, as rotas primária e secundária do metabolismo exibem um complexo mecanismo de regulação, competindo por moléculas que são intermediárias chaves para ambas.

Figura 2 - Perfil de concentração de glicose, crescimento celular e de produção de CPC durante uma fermentação em batelada alimentada com taxa de alimentação de 10,3 ml/h.



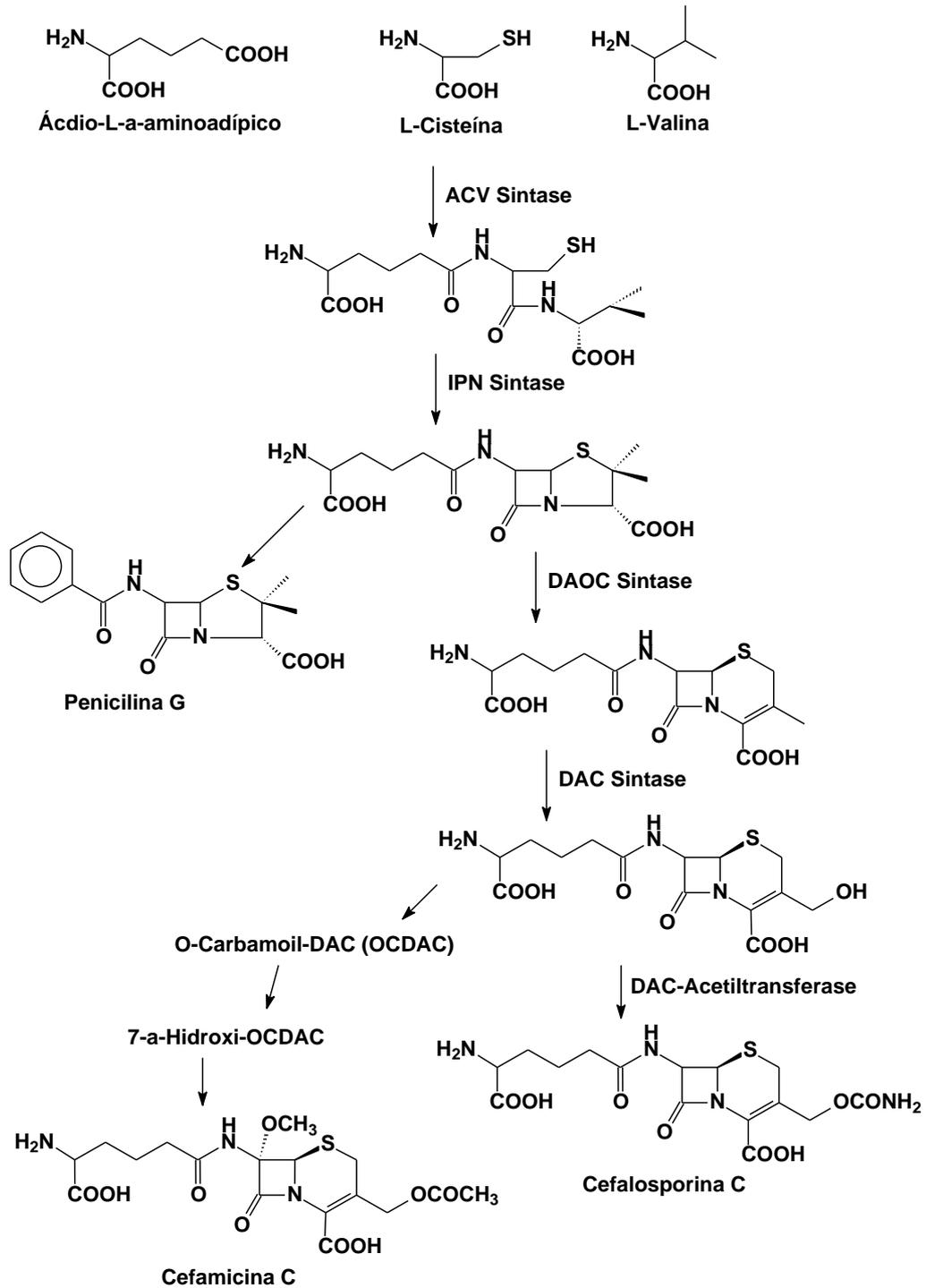
(Fonte: Adaptado de SILVA, 1998).

A rota biossintética da CPC começa com a síntese de três aminoácidos, a valina, a cisteína e o ácido α -aminoadípico. O primeiro passo da via é a reação da cisteína com o ácido α -aminoadípico, posteriormente, o produto reage com a valina, originando o tripeptídeo LLD-ACV (δ -(L- α -aminoadipil)-L-cistenil-D-valina). A primeira e a segunda reações são catalisadas pela enzima aminoadipil-cistenil-valina sintase (ACV-sintase). Esse intermediário sofre uma reação de ciclização e dá origem à isopenicilina N, catalisada pela enzima ciclase. Através de uma epimerização a isopenicilina N é convertida em penicilina. No próximo passo, a penicilina é convertida pela enzima expandase em Deacetoxicefalosporina C (DAOC) através de uma expansão no anel, a mesma enzima converte o DAOC em Deacetylcefalosporina C (DAC), e por fim, o DAC reage com uma acetil-coenzima catalisada pela enzima Deacetylcefalosporina C acetiltransferase dando origem à CPC (DEMAIN e ELANDER, 1999).

Durante as últimas décadas com as principais enzimas envolvidas na via sintética identificadas, bem como os intermediários da via, os estudos mostraram que a via biossintética das cefalosporinas está intimamente ligada à via das Penicilinas e também das cefamicinas. Alguns pontos críticos da via se diferem e levam a formação de um ou outro desses compostos. Outro ponto descoberto é que nenhum microrganismo é capaz de realizar todas as vias e produzir todos os

compostos (DEMAIN e ELANDER, 1999). A figura 3 mostra o fluxograma da via biossintética da CPC.

Figura 3 - Rota sintética da CPC.



(Adaptado de DEMAIN e ELANDER, 1999).

Com os processos metabólicos de produção da CPC elucidados, os pesquisadores passaram então a investigar as possíveis regulações metabólicas que poderiam resultar em aumento da produção da CPC. Vários estudos reportam importantes descobertas a cerca do tema. Demain, Newkirk e Hendlin (1963) demonstraram que através do atraso do metabolismo secundário poderia obter-se um maior rendimento na produção de CPC. Isso acontece porque no início da fase de crescimento, o microrganismo é sensível ao seu próprio antibiótico. Porém, após o crescimento, o mesmo torna-se resistente. Os autores testaram o efeito da manipulação do meio externo, variando a composição da fonte de carboidratos presente no meio em glicose e sacarose. Como resultado foi observado o consumo preferencial da glicose na fase de crescimento, resultando em alta taxa de crescimento do fungo, e quando o microrganismo passou a usar a sacarose como fonte de carbono observou-se o surgimento do antibiótico no meio. À opção de usar primeiramente a glicose na fase de crescimento atribuiu-se ao fato deste carboidrato ser mais facilmente metabolizado, disponibilizando energia rapidamente ao microrganismo. Outro fato observado mais tarde é o efeito repressor que a glicose causa em algumas enzimas da via de produção do antibiótico (BEHMER e DEMAIN, 1983).

O fenômeno de consumir preferencialmente um substrato a outro é denominado diauxia, segundo Schelegel (1990), com *Cephalosporium acremonium* acontece com a glicose em relação à sacarose durante a fase de crescimento. A composição do meio em sacarose e glicose 2,7 e 3,6%, respectivamente, mostrou-se uma maneira viável de atrasar o metabolismo secundário de produção do antibiótico em relação ao metabolismo primário, resultando em altas taxas de crescimento celular e de produção de CPC.

Procurando estabelecer a relação entre a concentração de glicose no meio e a produção de antibiótico, Zanca e Martin (1983) adicionaram diferentes concentrações deste carboidrato no momento da inoculação do microrganismo e os resultados deste experimento mostraram que o crescimento celular era proporcional a quantidade de carboidrato adicionada. Porém a quantidade de antibiótico produzido era máxima a uma concentração de cerca de 20 g.L⁻¹ de glicose. Acima dessa concentração a produtividade caía, indicando o efeito repressor da glicose, e abaixo deste valor, a produtividade foi prejudicada devido ao baixo crescimento celular do microrganismo.

Demain, Newkirk e Hendlin (1963) também mostraram o papel da metiotina como promotor da produção da CPC. Esse estudo mostrou que a ausência deste aminoácido durante o processo resulta em uma baixa na produção do antibiótico. Esse efeito foi creditado ao fato de que a metionina seria a molécula que fornece o átomo de enxofre para a CPC, sendo convertida na cisteína que entra na via. Mais tarde, Drew e Demain (1977) descobriram que além de fonte de enxofre, a metionina estimula algumas enzimas da via metabólica. O estudo de Matsumara (1981), onde linhagens do *C. acremonium* são comparadas, mostrou que a capacidade de acumular a metionina dentro da célula após o período de crescimento celular leva a melhores níveis de produção de antibiótico pelo microrganismo.

As fontes de nitrogênio também são alvo de estudos visando aumentar a produtividade de CPC. Shen e colaboradores (1984) estudaram a influência de fontes orgânicas e inorgânicas de nitrogênio adicionadas ao meio de fermentação, os resultados mostraram que fontes inorgânicas como o nitrato de potássio levam a baixos rendimentos na produção de CPC, ao contrário de fontes orgânicas como a arginina e a asparagina. Os resultados apontaram também que o íon amônio é capaz de exercer uma influência negativa sobre a atividade de algumas enzimas da via sintética da CPC, proporcionando decréscimo na produção do antibiótico. Além dos estudos citando a importância das fontes de carbono, enxofre e nitrogênio encontram-se ainda na literatura pesquisas que também relatam a influência do fósforo (ZHANG, WOLFE e DEMAINE, 1988) e da presença de outros compostos inorgânicos nas culturas que visam produzir a CPC (BAILEY e OLLIS, 1986).

E) Produção: A produção industrial da CPC é realizada atualmente pelo processo de fermentação em batelada alimentada, em que a matriz energética pode ser tanto carboidratos simples, complexos ou até mesmo óleos ricos, como o óleo de soja. Como fonte de nitrogênio no processo são usadas semente de algodão e soja, e também amônia e sulfato de amônia, que contribuem com a regulação do pH. A água de maceração do milho também é adicionada, contribuindo como fonte de aminoácidos, vitaminas e elementos traço. A disponibilidade de oxigênio dissolvido é um fator de extrema importância durante o processo fermentativo, pois, as expressões máximas das enzimas ciclase e expandase estão intimamente ligadas a esse fator e essa disponibilidade resulta em rápida produção de CPC. A metionina também é adicionada no processo e sua função, além de fonte de enxofre, é ajudar

no aumento da eficiência da transformação do micélio em atrosporo e é na forma de atrosporo que o microrganismo produz a CPC. O pH e a temperatura do processo também são controlados e mantidos nas faixas de 6,2 a 7,0 e 24 a 28°C, respectivamente (ELANDER, 2003).

Apesar da produção em larga escala realizada por batelada alimentada ser um processo eficiente e de alta produtividade (ELANDER, 2003), encontram-se na literatura diversos estudos a cerca de variações em parâmetros operacionais visando reduzir custos e aumentar a produtividade. As fermentações em batelada alimentada permitem a variação da composição do meio durante o processo. Dessa forma, é possível realizar fermentações onde os nutrientes necessários para a fase de crescimento do microrganismo são diferentes daqueles necessários para a produção do produto de interesse. Em geral os processos em batelada são os mais usados para a produção de CPC, os estudos envolvendo essa técnica de fermentação tanto no modo contínuo quanto no modo semi-contínuo mostram tentativas de testar variações nas condições operacionais que possibilitem controlar a quantidade de nutrientes, a quantidade de oxigênio, a taxa de crescimento celular e a presença de inibidores no meio fermentativo para regular o metabolismo do fungo, a fim de se atingir o máximo de produtividade do antibiótico.

Zhou e colaboradores (1992a) estudaram a influência da concentração de oxigênio dissolvido na biossíntese da CPC. Usando uma cepa de *Cephalosporium acremonium* de alta produtividade e o modo de batelada alimentada em tanque agitado para a fermentação, os autores monitoraram a concentração de CPC e de seus precursores penicilina N, DAC e DAOC além de algumas outras moléculas como a valina, a cisteína, o ácido α -aminoadípico, α -aminoadipil-cisteína e a α -aminoadipilcistenil-valina, enquanto variavam a concentração de oxigênio dissolvido no meio entre 5 a 40% do seu valor de saturação. Os resultados quando o oxigênio dissolvido estava a 5% mostraram que a concentração de CPC diminuiu de 7,2 para 1,1 g.L⁻¹, e a penicilina N aumenta de 2,57 para 7,65 g.L⁻¹. Quanto aos precursores da CPC, o DAC mostrou grande queda e o DAOC não foi influenciado e os peptídeos consumidos normalmente. Os autores atribuem o baixo rendimento da produção de CPC à inibição da enzima expandase devido ao baixo teor de oxigênio dissolvido no meio. Quando a taxa de oxigênio dissolvido foi para 20% foram encontradas as melhores taxas de produção da CPC, e rendimento de consumo dos nutrientes, mostrando que abaixo desta concentração a síntese de CPC é reprimida.

Acima do valor de 20% de saturação os autores concluíram que a síntese da CPC não foi afetada.

Os mesmos autores (ZHOU *et al*, 1992b) estudaram também a influência do meio de cultura na produção de CPC, monitorando as mesmas moléculas anteriormente citadas e avaliando a variação da quantidade de nutrientes como: farinha de amendoim, glicose, fosfato e metionina. Os resultados obtidos mostraram que o ótimo rendimento ocorre em concentrações de glicose abaixo de $0,5 \text{ g.L}^{-1}$, de fosfato entre 260 a 270 mg.L^{-1} , 100 g.L^{-1} de farinha de amendoim, onde a performance do processo atingiu produtividade máxima de $118 \text{ mg.L}^{-1}\text{h}^{-1}$ de CPC, gerando $11,84 \text{ g.L}^{-1}$ de CPC ao fim do processo, $17,34 \text{ g.L}^{-1}$ de antibióticos totais.

Fatores como pH e temperatura também influenciam diretamente no processo de crescimento do microrganismo e de produção da CPC. Chu e Constantinides (1988) reportaram o uso de faixas controladas de pH e temperatura durante um processo de fermentação em batelada. As faixas usadas nos experimentos foram de 6,2 a 7,4 para o pH e 24 a 32°C para a temperatura. Os resultados obtidos mostraram a relação ideal entre os parâmetros e quando os mesmos foram aplicados, os autores conseguiram uma concentração máxima de 550 mg.L^{-1} de CPC em uma fermentação de 100 horas.

Observa-se também a tentativa de aumento da produtividade através da imobilização das células do microrganismo em diferentes materiais. Araújo *et al* (1996) reportam o uso desta técnica imobilizando o fungo em partículas de alginato de cálcio e realizando a fermentação em reator tipo torre. Os resultados mostraram que a produtividade de CPC por hora foi maior em relação a fermentação realizada com as células livres, cerca de 1,3 vezes maior, mesmo com o crescimento celular maior no meio onde as células estavam livres. Porém, a técnica de imobilização celular apresenta alguns problemas, como, a resistência à transferência de oxigênio necessária para o microrganismo realizar seu metabolismo.

Outro fator investigado é o uso de outros tipos de modalidade de fermentação para a produção da CPC. Em um desses estudos, Adinarayana *et al* (2003) investigaram o uso da fermentação em fase sólida para produção da CPC. Os autores sugeriram esse método por ele ser mais barato em vista da fermentação em meio submerso, pois utiliza-se de matérias-primas não industrializadas como resíduos de biomassa e também pelo baixo custo de operação. No estudo, os autores usaram uma cepa de *A. chrysogenum* e testaram farelo de trigo, de arroz e

cevada como substratos do meio de cultura sólido. Além disso, os autores estudaram alguns fatores que poderiam afetar a fermentação, como: umidade inicial, concentração salina, temperatura, pH, entre outros. Como resultado, obtiveram as condições ótimas dos fatores propostos. A seguir aplicaram essas condições no processo de fermentação e obtiveram o máximo de produção de CPC, da ordem de 22,3 mg de CPC/g de CPC, reportando assim, uma diferente possibilidade para o processo produtivo da CPC.

Outra linha de pesquisa que se destaca na busca por aumentar a produtividade da CPC é a engenharia genética das cepas dos fungos produtores. Nessa linha o objetivo é descobrir os genes que estão ligados à produção da CPC e buscar formas de aumentar a expressão dos mesmos. Com o desenvolvimento da biologia molecular encontram-se na literatura trabalhos que reportam a identificação dos genes e também de uma variedade de cepas geneticamente modificadas. Skatrud *et al*, (1989) citado por Elander (2003) realizaram um trabalho onde o gene *cef EF* foi clonado, resultando em aumento da produção da CPC pelo microorganismo e reduzindo a produção de penicilina N. Em escala laboratorial a produtividade subiu em 47% e em escala piloto em 15%. Basch e Chiang (1998) também citados por Elander (2003) trabalharam com cepas de *A. chrisogenum* modificadas geneticamente com aumento no número de gene *cefEF* e mostraram que os níveis do contaminante Deacetilcefalosporina C caíram quando o caldo fermentado produzido pelas cepas modificadas em fermentadores de grande porte foi submetido ao processo de recuperação.

2.2 PROCESSO DE DOWNSTREAM: Operações unitárias envolvidas no processo de recuperação e purificação de produtos oriundos de bioprocessos.

Geralmente os caldos fermentados de bioprocessos são extremamente complexos, podendo conter uma variedade de componentes, como substratos não convertidos em produtos, células mortas, nutrientes diversos do meio de cultivo e o produto de interesse que pode se encontrar no meio extra ou intracelular. Devido a essa complexidade, várias operações são necessárias para promover a separação e purificação do produto de interesse de maneira eficiente. Dentre as operações mais utilizadas para recuperação de produtos oriundos de bioprocessos podemos citar: Filtração, centrifugação, separação por membranas, resfriamento, aquecimento,

secagem, extração por solvente, cromatografia de adsorção, de troca iônica, precipitação, cristalização, entre outras. Os passos necessários para realizar esse processo estão intimamente ligados à natureza e propriedades do composto de interesse a ser recuperado e também de propriedades do caldo fermentado, a pureza necessária do produto por sua vez está ligada à sua finalidade de aplicação. (NAJAFPOUR, 2007).

Kilikian e Pessoa Jr. (2005) dividem em quatro grandes passos o processo de *downstream*: clarificação do caldo ou separação de insolúveis, nesta etapa os sólidos presentes são removidos do meio, assim como células e fragmentos celulares. Esta etapa é realizada através de operações como centrifugação e filtração. A segunda etapa é a purificação de baixa resolução ou isolamento do produto, normalmente realizada através de adsorção, precipitação ou extração por solvente. Nesta etapa o produto é separado de outros componentes que apresentam características físico-químicas diferentes das suas. Na terceira etapa é realizada a purificação de alta resolução onde serão separados do produto principal os componentes que exibem propriedades físico-químicas similares a dele. Essa etapa é por operações de seletividade alta como a precipitação fracionada e a cromatografia. Por fim, quando possível e/ou necessário, realiza-se a quarta etapa, que é a obtenção do produto na forma de cristal. Para esse objetivo usam-se principalmente as operações de cristalização e secagem. Caso o produto de interesse seja um metabólito intracelular, os autores destacam que o passo de rompimento celular deve ser acrescentado no processo. As principais operações usadas em cada etapa do processo de *downstream* podem ser observadas na tabela 2.

A realização do processo de *downstream* pode representar 50% do custo total do processo produtivo de uma determinada molécula de interesse, por isso, as operações envolvidas devem ser planejadas de forma a otimizar a aplicação, para que se possível usar a mesma operação para a realização de mais de uma etapa do processo. O número de operações também depende da finalidade do produto. Produtos de aplicação farmacêutica, por exemplo, requerem alto grau de pureza devido a sua aplicação, e isso é um fator que torna o processo de *downstream* mais oneroso ainda. Por outro lado, a obtenção desses produtos com elevado grau de pureza torna alto o valor agregado do mesmo. Esse fato faz com que o mercado

pague um grande valor pelo produto, tornando compensáveis os custos gerados pelo processo de downstream (KEIM e LADISCH, 2000).

Tabela 2- Principais operações unitárias envolvidas nas etapas de Downstream

Etapa	Operações envolvidas
Clarificação	Filtração, centrifugação
Rompimento celular	Ultrassom, moagem com moinho de bolas, rompimento químico ou enzimático
Purificação de baixa resolução	Precipitação, ultrafiltração, extração por solventes
Purificação de alta resolução	Métodos cromatográficos, membranas adsortivas
Refinamento	Cristalização, liofilização

Fonte: Adaptado de KILIKIAN e PESSOA Jr., 2005.

Elander (2003) descreve em sua revisão sobre produção de antibióticos β -lactâmicos as principais rotas adotadas pela indústria para realização do processo de downstream destes compostos. No geral, pencilinas, cefalosporinas, cefamicinas e carbapenens seguem um roteiro parecido de operações para purificação do produto. Primeiramente passando por operações de separação de sólidos e clarificação do caldo, seguidos por processos de purificação baseados em processos adsortivos, de troca-iônica e também de extração por solventes. Por fim, passam por etapas de cristalização.

Detalhadamente, o processo de purificação industrial da CPC descrito por Elander (2003) é realizado através dos seguintes passos: O caldo fermentado é resfriado rapidamente até uma temperatura entre 3 a 5°C, depois disso é submetido ou a filtração ou centrifugação para promover a remoção dos sólidos presentes, principalmente os micélios do fungo produtor. O processo segue para etapa de purificação, nesta etapa o caldo contém além da CPC, os compostos DAC, DAOC, Isopenicilina N além dos precursores biossintéticos. Para realização desta etapa, são usadas duas estratégias diferentes, algumas companhias usam a adsorção em carbono ativado ou outro adsorvente, seguido de cromatografia de troca-iônica, o que resulta em CPC de alta pureza, que é convertida posteriormente em Ácido 7-aminocefalosporânico (7-ACA). A segunda estratégia consiste em gerar derivados substituídos, onde o grupo amino da cadeia lateral α -aminoadipil é substituída no C-

7, gerando dois derivados: o N-2,4-Diclorobenzoil cefalosporina C e o tetrabromocarboxybenzoil cefalosporina C. Esses derivados podem ser cristalizados a partir de soluções ácidas. Esses derivados substituídos também podem formar sais a partir da reação com bases como dicitclohexilamina ou a dimetilbenzilamina. Esses sais podem ser extraídos por solventes, porém o processo de extração deve ser repetido várias vezes até a obtenção do produto com elevada pureza.

Dentre as estratégias de purificação para produtos de biotecnologia, o processo de adsorção se destaca por propiciar a pureza necessária, com bons fatores de concentração, além de ser um processo não destrutivo e energeticamente eficiente.

2.3 PROCESSO DE ADSORÇÃO

O processo de adsorção consiste em uma operação unitária onde uma corrente de um fluido, seja gás ou líquido, interage com uma fase estacionária sólida, e esta fase sólida é capaz de interagir de diferentes formas com os componentes desta corrente fluida. Normalmente, a fase estacionária é composta por pequenas partículas do sólido alocadas em um leito fixo, que pode ser uma coluna ou um reator. O fluido é então passado através deste leito onde ocorre o processo de adsorção, quando o leito é totalmente saturado com as moléculas do fluido, o fluxo do mesmo é interrompido e então o leito pode ser regenerado através de temperatura ou através de outro método de dessorção. Nesta operação o material adsorvido é chamado de adsorbato e é este que é recuperado após o processo de dessorção (GEANKOPLIS, 2003). A troca iônica é considerada como um processo de adsorção por alguns autores e é possível encontrar termos como adsorção de íons na literatura (BARBOZA, ALMEIDA E HOKKA, 2003).

Os processos de adsorção são usados para a purificação desde a antiguidade, onde, por exemplo, os povos usavam carvão e areia para purificação de água e obtenção de água potável. Apesar do uso desta técnica no dia-a-dia, uma abordagem teórica a cerca do processo não era desenvolvida e o mesmo era usado apenas com base em observações e tentativas. O primeiro registro teórico desenvolvido data de 1773 e após este desenvolvimento o processo se difundiu rapidamente e é usado em diversos ramos, como indústrias farmacêuticas,

alimentícia, de saneamento e petrolífera (KAMMERER, KAMMERER e KARLER 2011).

2.3.1. Mecanismos de separação

Como mencionado anteriormente, o processo de adsorção se baseia na interação entre as moléculas do fluido e o adsorvente. Existem diversas maneiras de ocorrerem essas interações, sendo que as mesmas estão diretamente ligadas ao mecanismo de separação envolvido no processo, esses podem ser do tipo: Físico, químico ou mecânico (COLLINS, 2006).

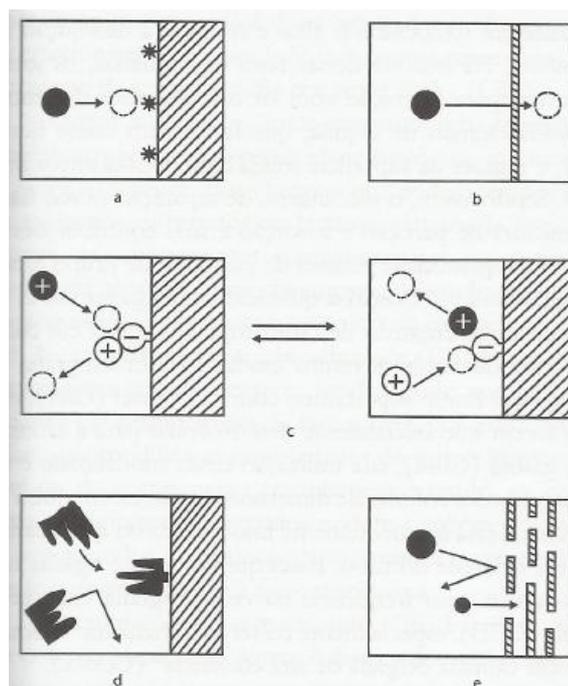
Os processos físicos conhecidos como de sorção – adsorção e absorção - se baseiam em atrações dipolares como, forças de Van der Waals, atrações Coulômbicas e também por formação de ligações de Hidrogênio. Quando a fase estacionária é um sólido a adsorção ocorre na interface entre o sólido e o fluido onde se encontram os sítios ativos do sólido. Quando a fase estacionária trata-se de um líquido espalhado sobre a superfície do sólido inerte, o processo de separação é realizado por absorção ou partição e é baseado na solubilidade dos compostos nesta fase estacionária (COLLINS, 2006).

Outro processo é o químico, os grandes representantes desta modalidade são os processos por troca-iônica e os processos baseados em afinidade biológica. No processo por troca-iônica, uma matriz ou um suporte contém em sua superfície grupos que podem ser ionizáveis, dessa forma são obtidos trocadores de íons. Para o processo ocorrer, uma fase móvel tipo solução iônica é passada através do leito contendo o trocador. O composto de interesse deve estar ionizado nessa solução, dessa forma, o mesmo será capaz de competir pelos sítios carregados do trocador e então ser retido. Caso a matriz seja carregada negativamente ela é classificada como trocadora de cátions, pois libera os grupos carregados positivamente para a fase móvel e retém os cátions presentes na mesma. Caso contrário a fase estacionária sendo carregada positivamente, ela será capaz de reter os ânions da fase móvel e liberar os ânions previamente ligados a ela para essa fase, e é classificada como trocadora de ânions. A fase móvel empregada neste processo deve exibir propriedades compatíveis com o trocador escolhido e normalmente é tamponada (COLLINS, 2006). A eluição dos íons retidos é realizada através da passagem de íons competidores que possuam maior afinidade com a matriz e tem

capacidade de deslocar novamente o íon retido para a fase móvel. Outro processo químico usado é conhecido por bioafinidade. Nesta modalidade a fase estacionária contém grupos biológicos ligados ao suporte que são complementares aos presentes na fase móvel, por exemplo, fase estacionária contendo antígenos ligados e fase móvel contendo anticorpos. Neste modo, a eluição é realizada através de alterações na fase móvel, como aumento da acidez que modifica propriedades da molécula ligada ao suporte ou até mesmo da molécula retida (Collins *et al*, 2006).

O processo mecânico é encontrado na modalidade de cromatografia por exclusão. O mecanismo de separação neste método consiste na diferença de tamanho das moléculas a serem separadas. Uma matriz inerte com partículas de tamanho, forma e porosidade uniformes serve como fase estacionária, desse modo, moléculas menores penetram os poros ficam em equilíbrio com a fase móvel intra e intersticial, as moléculas maiores são excluídas totalmente dos poros equilibrando-se com a fase móvel intersticial apenas e moléculas de tamanho médio penetram seletivamente nos poros de acordo com sua compatibilidade de tamanho. A saída da coluna é dada então em função do tamanho da molécula. Os mecanismos descritos podem ser observados na figura 4.

Figura 4 - Mecanismos cromatográficos a) Adsorção, b) Partição, c) Troca iônica, d) Bioafinidade e e) Exclusão.



Fonte: Adaptado de COLLINS, 2006.

2.3.2 Propriedades dos adsorventes

Existem diversos materiais disponíveis no mercado para a realização do processo de adsorção. Collins (2006) cita que as faixas de tamanho das partículas dos adsorventes variam de 63 até 200 μm . Já Geankoplis (2003) cita que o tamanho das partículas pode variar de 0,1 a 12 mm, além disso, esse autor relata que as partículas podem vir na forma de pequenos *pellets* ou grânulos. Geralmente, a partícula do adsorvente é altamente porosa, sendo que essa porosidade pode chegar até a 50% do volume total da partícula. A área dessas partículas também é outro fator de extrema importância já que o processo de adsorção ocorre na interface entre a partícula e o fluido, as áreas dos adsorventes podem variar de 100 a 2000 m^2/g de adsorvente. Os materiais mais usados para obtenção dos adsorventes são listados na tabela 3.

Tabela 3 - Principais materiais usados como adsorventes em processos de adsorção.

Material	Características
Carbano ativado (carvão ativado)	Material microcristalino, obtido por decomposição térmica da madeira, usado principalmente na adsorção de orgânicos.
Silica Gel	Obtido por tratamento ácido do silicato de sódio, usado em desidratação de gases e fracionamento de hidrocarbonetos.
Alumina ativada	Obtenção através de tratamento térmico do óxido de alumínio hidratado, usado em secagem de gases e líquidos.
Zeólitas	Aluminossilicatos com porosidade uniforme que é definida de acordo com a aplicação. Usada para diversos processos.
Polímeros sintéticos e resinas	Sintetizados a partir de polimerização. Para uso em substâncias apolares, polímero de estireno e Divinilbenzeno, para moléculas polares, principalmente feitos de ésteres acrílicos.

Fonte: Adaptado de GEANKOPLIS, 2003.

2.3.3 Relações de equilíbrio no processo de adsorção e cinética do processo

O equilíbrio entre a concentração de soluto no fluido e a concentração de soluto no sólido tem comportamento parecido com as relações de equilíbrio de concentração de gases solubilizados em líquidos. Essas relações são representadas através de parâmetros relacionados com a quantidade de adsorbato em relação quantidade de adsorvente (q) (massa de adsorbato/ massa de adsorvente) e a quantidade de adsorbato em relação à quantidade de fluido (c) (massa de adsorbato/ volume de fluido) (GEANKOPLIS, 2003). Essas relações são obtidas à temperatura constante e são denominadas isotermas de adsorção. Existem alguns modelos desenvolvidos de isotermas usados para explicar o comportamento dos processos de adsorção. A seguir serão descritos brevemente os modelos de isoterma usados em processos de adsorção.

a) Modelo linear:

É expresso através de uma expressão similar à lei de Henry, onde K é uma constante determinada experimentalmente. Essa relação não é comumente encontrada nos processos de adsorção, porém, na região de concentrações diluídas pode ser usada para a aproximação de muitos sistemas. A equação 1 descreve o modelo linear (GEANKOPLIS, 2003). Onde q é a concentração do adsorbato na fase sólida no equilíbrio, c é a concentração do adsorbato na fase líquida. K é a constante do modelo e dá indicações sobre a afinidade do processo de adsorção, sendo que maiores valores mostram que o processo de adsorção é favorecido. Essa relação tem a vantagem de ser simples para o tratamento de dados, já que é expressa em função de apenas um parâmetro. Porém, seu uso para o ajuste de isotermas é indicado apenas em faixas onde a solução está diluída, fato que restringe o uso desta relação.

$$q = Kc \quad (1)$$

b) Modelo de Freundlich:

A equação 2 descreve o modelo de isoterma de Freundlich. Esse modelo aproxima-se bem de diversos processos de adsorção física, principalmente para líquidos. O parâmetro K e o parâmetro n são determinados experimentalmente e são características intrínsecas do processo (GEANKOPLIS, 2003). Os parâmetros K e n dão indicações da energia e da intensidade da adsorção, apesar disso, estes parâmetros não possuem significado físico exato.

A relação de Freundlich já foi utilizada por Lee, Park e Moon (1997) para a modelagem do processo de adsorção da CPC nas resinas XAD2, SP207 e SP850.

$$q = Kc^n \quad (2)$$

c) Modelo de Langmuir:

O modelo desenvolvido por Langmuir tem embasamento teórico e surge assumindo que somente determinado número de sítios ativos do adsorvente estão disponíveis para a adsorção, somente uma monocamada é formada sobre a superfície e a adsorção é um processo reversível e que atinge um estado de equilíbrio. Onde q_0 e K são constantes, determinadas empiricamente, e q é definido como massa de adsorbato por massa de adsorvente (GEANKOPLIS, 2003). Segundo Weber (1985) a máxima adsorção ocorre quando uma monocamada de adsorbato recobre a superfície da resina, além disso, neste modelo assume-se que não existe interação entre as moléculas de adsorbato e que a energia de adsorção é constante. A equação 3 descreve este modelo.

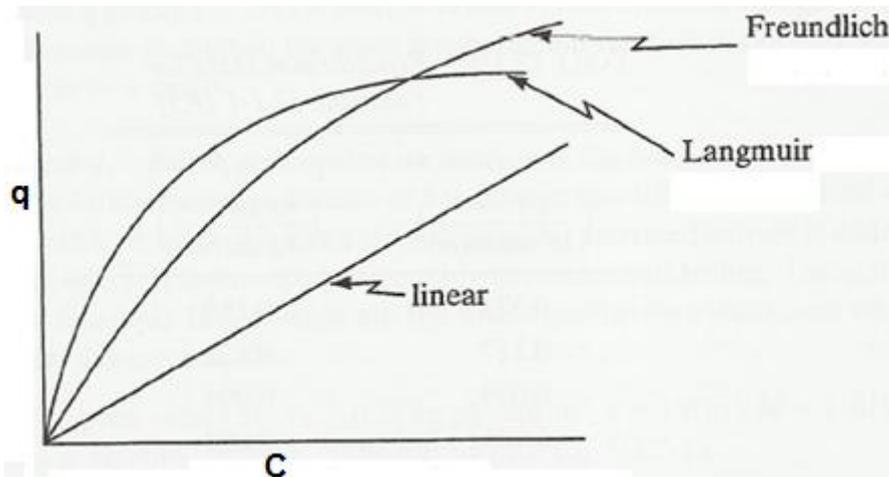
$$q = \frac{q_0 c}{K+c} \quad (3)$$

Esta relação de Langmuir foi usada por Ramos, Otero e Rodrigues (2004) para modelar o processo de adsorção da CPC nas resinas XAD4 e XAD16.

Os modelos de Isoterma auxiliam na determinação do tipo de adsorvente, na quantidade utilizada do mesmo e na interpretação de dados termodinâmicos,

como entalpias de adsorção. A figura 5 descreve o comportamento gráfico dos modelos descritos anteriormente.

Figura 5 - Modelos de Isotermas comuns Linear, Freundlich e Langmuir.



Fonte: Adaptado de GEANKOPLIS, 2003.

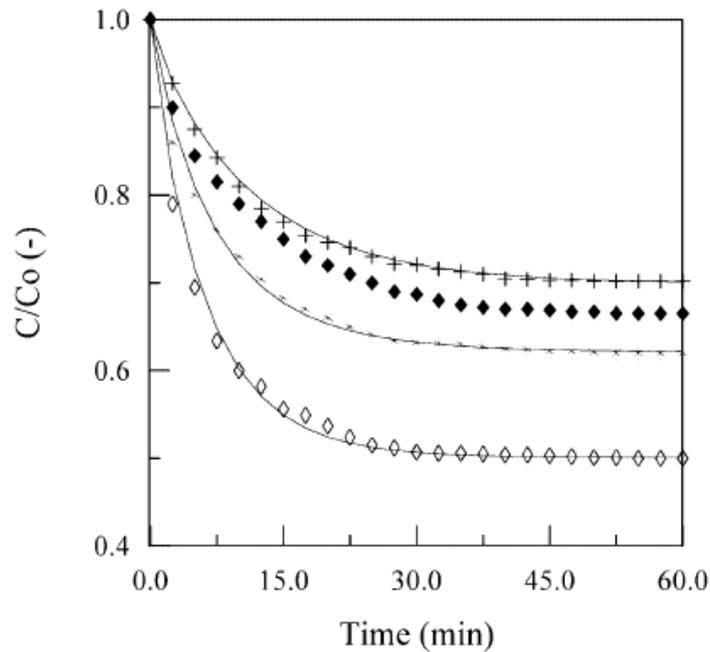
Estudos sobre a cinética também podem fornecer diversas informações sobre os fenômenos envolvidos no processo de adsorção. Diversos autores abordam o processo de adsorção de forma que este seja tratado como uma reação química, onde o adsorbato “reage” com o adsorvente formando um complexo. Essa pseudo-reação pode ser vista como reação de primeira ordem, de pseudo-primeira ordem e de segunda ordem. Desta forma, é possível a modelagem do processo através de constantes de velocidade e dados obtidos das isotermas. Esses dados podem indicar se o processo é favorável e, além disso, é possível obter estimativas de alguns parâmetros termodinâmicos do processo.

Barboza, Hokka e Maugeri (2002) estudaram a adsorção da CPC na resina neutra XAD2, para a modelagem do processo os autores partiram da suposição que a adsorção da CPC na resina XAD2 é uma reação onde o antibiótico e a resina dão origem a um complexo CPC+resina mais energia e a dessorção é a reação inversa onde o complexo dá origem a resina livre, CPC e energia.



Neste modelo os autores ainda assumiram que mais de uma molécula de CPC é adsorvida por sítio ativo da resina. Os autores obtiveram os perfis cinéticos do processo monitorando a variação de C/C_0 em função do tempo, partindo de soluções de diferentes concentrações a temperatura constante de 25°C. Os perfis obtidos são mostrados na figura 6, a seguir.

Figura 6 - Perfis cinéticos da adsorção da CPC na resina neutra XAD2.



Fonte: Adaptado de BARBOZA, HOKKA e MAUGERI, 2002.

Além dos perfis cinéticos, os autores obtiveram também as isotermas de adsorção. Por fim, eles concluíram que é possível realizar o processo de adsorção da CPC na resina XAD2, e que a temperatura e a concentração da solução de CPC afetam o processo.

Baseado na proposta de mecanismo descrita anteriormente, a resina IRA410 também pode se comportar como um reagente da “reação” de adsorção, onde nos sítios da resina o íon cloreto é trocado pela CPC carregada negativamente, originando o “produto” da reação que é o complexo CPC+Resina.

2.3.4 Modos de operação

Existem dois principais modos de operação de sistemas de adsorção destinados à purificação de produtos. São os sistemas por reator alimentado e por colunas de leito fixo. A seguir os modos serão descritos, em especial o modo em colunas de leito fixo por ser tema de interesse do presente trabalho.

- Adsorção em reatores alimentados.

Esse modo de operação é aplicado principalmente quando as quantidades do produto a ser adsorvido são pequenas. As relações de equilíbrio do sistema podem ser obtidas através dos modelos de Isotermas descritos anteriormente e o balanço de massas do sistema é obtido através da equação 4 (GEANKOPLIS, 2003). Onde a concentração da alimentação inicial é dada por c_f e no equilíbrio por c , a concentração inicial do soluto adsorvido no sólido é q_f e no equilíbrio q , M é a quantidade de adsorvente em kg e S o volume de alimentação em m^3 .

$$q_f M + c_f S = q M + c S \quad (4)$$

No ponto onde a isoterma de adsorção e o gráfico de q contra c do balanço se encontram são encontrados os valores de q e c no equilíbrio (GEANKOPLIS, 2003).

Para a realização da operação, um reator é alimentado em forma de batelada ou em forma contínua com a solução contendo a substância a ser adsorvida e também com o material adsorvente. Em seguida promove-se agitação no interior do sistema e, com o passar do tempo ocorre adsorção do componente de interesse no adsorvente. Após o período necessário a solução de alimentação é retirada do reator e o adsorvente contendo o adsorbato é então submetido a uma etapa de lavagem, posteriormente alimenta-se o sistema com a solução que promoverá a eluição do componente adsorvido e então será gerada uma solução concentrada do componente de interesse. O adsorvente passa por um ciclo de regeneração caso seja necessário e a operação pode ser repetida (ALMEIDA, BARBOZA e HOKKA, 2003).

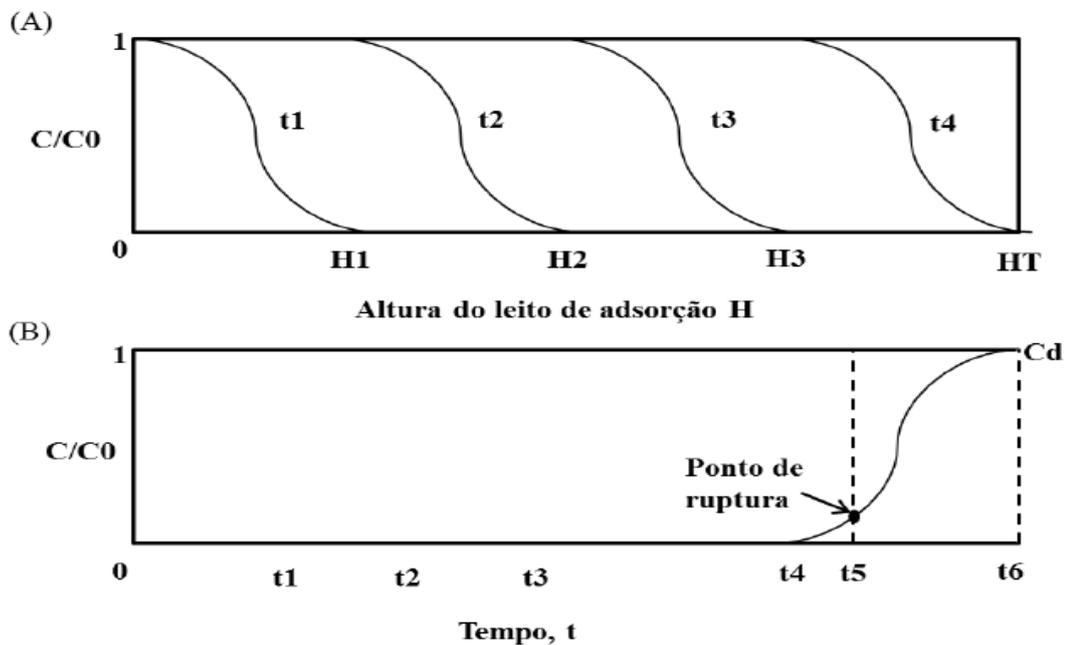
- Colunas de leito fixo

O processo de adsorção realizado em colunas de leito fixo é mais complexo do que o realizado através de reatores. O fluido a ser tratado percorre a coluna com um fluxo constante, o processo depende da resistência à transferência de massa e também de outros fatores dinâmicos do sistema. O perfil de concentração do soluto na solução de alimentação varia conforme o tempo e a posição dentro da coluna, decaindo rapidamente conforme a solução avança pela coluna, sendo que esse passo se repete várias vezes até o fim da coluna. Esse perfil de concentração do adsorbato no interior da coluna é mostrado na figura 7a, e é obtido através do gráfico de C/C_0 contra H , onde C é a concentração do adsorbato em determinado ponto da coluna, C_0 a concentração inicial do adsorbato no fluido e H o comprimento da coluna.

Conforme ocorre a passagem do tempo, as partículas do adsorvente próximas à entrada da coluna são saturadas pelo adsorbato e a adsorção começa então a ocorrer em um ponto imediatamente posterior ao ponto saturado. A diferença de concentração durante o caminho é a força motriz do processo.

Enquanto o processo de transferência de massa ocorre no interior da coluna, na saída dela a concentração do soluto é aproximadamente igual à zero, e continua com este valor até que a zona de transferência de massa atinja o fim da coluna em um determinado tempo. Quando chega este momento, a concentração do soluto na saída da coluna aumenta até atingir um ponto conhecido como ponto de ruptura. Depois do mesmo a concentração aumenta rapidamente até atingir um ponto onde o leito da coluna não é mais efetivo para promover a adsorção. O ponto de ruptura é definido como sendo o ponto onde C/C_0 é igual aos valores de 0,01 a 0,05. O ponto em que o leito não é mais efetivo é igual a C_d sendo que este é aproximadamente igual a C_0 . Esse comportamento é visualizado através das curvas de ruptura geradas por gráficos de C/C_0 em função do tempo decorrido. Na figura 7b é possível observar uma curva de ruptura representativa.

Figura 7 - Perfis de concentração do adsorbato. a) Em várias posições no interior da coluna, b) Curva de ruptura ao fim da coluna.



Fonte: Adaptado de GEANKOPLIS, 2003.

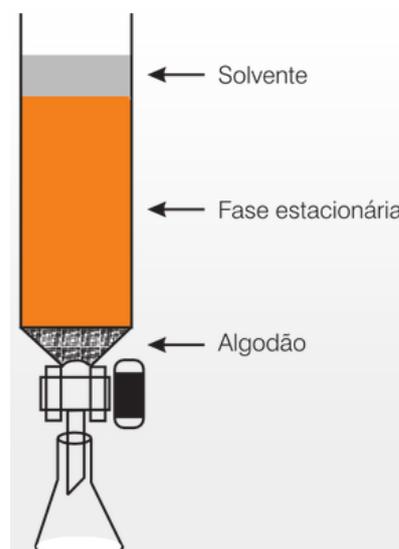
As curvas de ruptura são ferramentas extremamente importantes, pois a partir delas é possível calcular uma série de parâmetros que ajudam a realizar o aumento de escala da coluna, bem como obter a eficiência do leito em diversas condições, promovendo redução de custos. Os cálculos a cerca das curvas de ruptura serão apresentados posteriormente na seção de materiais e métodos.

Em escala industrial o processo é operado de duas formas principais: A primeira e mais usada, o modo em batelada e também o modo em fluxo contínuo, onde várias colunas se revezam nos ciclos. No modo batelada alimentação é injetada na coluna até que ocorra a saturação do leito, após isso a alimentação é interrompida e a coluna é lavada com água ou outra solução para remoção de materiais não adsorvidos dos espaços restantes. Com a coluna lavada, inicia-se então o passo de dessorção dos materiais, que pode ser realizado através de soluções eluentes adequadas ou também através de variação de condições como, variações de pH ou de temperatura, nesta etapa a variação da condições de forma adequada é que possibilita a separação dos compostos, por promover a dessorção diferenciada dos mesmos levando a separação. Após a dessorção é realizado novamente um processo de lavagem e posteriormente a coluna é submetida ao processo de recondicionamento para restaurar os sítios ativos do material

adsorvente e preparar a coluna para um novo ciclo de uso. No modo de fluxo contínuo várias colunas se revezam nos passos descritos para o processo em batelada, sendo que enquanto uma está sendo alimentada, a outra está passando pelo processo de lavagem e a próxima pelo processo de adsorção e assim por diante, sem que haja interrupção dos fluxos durante o processo (GEANKOPLIS, 2003).

Em escala laboratorial, a coluna cromatográfica é geralmente feita de vidro, na forma de tubo e colocada na posição vertical, para que o fluxo siga por força da gravidade, sua extremidade superior é aberta e a inferior termina em uma torneira que permite a regulagem da vazão. O recheio deve ser colocado uniformemente na coluna de forma a evitar a presença de bolhas de ar no seu interior, pois esses espaços podem gerar alargamentos nas bandas cromatográficas. Para isso normalmente o recheio é agitado em um frasco contendo a fase móvel até que se obtenha uma pasta que é adicionada na coluna já com um terço do seu volume preenchido pela fase móvel, esse recheio é suportado por um pedaço de algodão no início da coluna. A figura 8 mostra um exemplo de coluna cromatográfica. Após a montagem da coluna a amostra é injetada no topo da coluna, e a fase móvel é adicionada cuidadosamente de forma que se obtenha uma camada acima do recheio. Os compostos vão eluindo pela coluna, sendo que aqueles que têm maior afinidade pelo adsorvente demoram mais para percorrer o caminho do que os de menor afinidade.

Figura 8 - Esquema de montagem de uma coluna cromatográfica.



Fonte: Adaptado do site www.qnint.s bq.org.br, visitado em 06/03/2014.

A solução eluente também influencia na retenção dos compostos, variações nas suas características podem acarretar em melhores separações e diminuição do tempo de corrida. Essas alterações podem ser obtidas por aumento de polaridade da fase, por exemplo, colunas operando em fase normal, onde a fase estacionária é mais polar que a fase móvel, os compostos serão eluídos mais rapidamente com aumento na polaridade da fase móvel. E na situação contrária, coluna operando em fase reversa, onde a fase estacionária é menos polar que a fase móvel, a diminuição da polaridade da fase móvel gerará a diminuição da retenção dos compostos. Os modos em que a eluição é realizada durante o processo cromatográfico são o isocrático, onde a constituição da fase móvel é a mesma durante todo o processo ou o modo gradiente, onde a composição da fase móvel é alterada durante o processo. O modo gradiente pode ser realizado de duas formas, continuamente durante a corrida ou em etapas graduais.

Ao fim da eluição as frações podem ser coletadas manualmente ou por coletor automatizado. A quantificação é realizada através de alguma técnica conveniente a natureza do composto de interesse. Para se reutilizar o leito da coluna em uma nova corrida, assim como no processo industrial, a mesma deve ser submetida ao processo de lavagem e recondicionamento. (COLLINS, 2006).

2.3.5 Adsorção por troca iônica

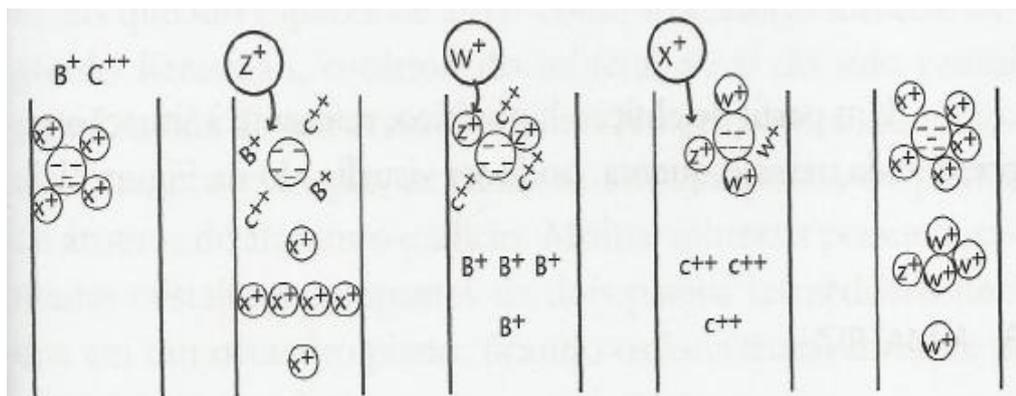
Os primeiros registros a cerca do uso de materiais trocadores de íons aplicados a processos de separação e purificação remonta ao ano de 1850. Onde os químicos daquela época descobriram a capacidade do solo em remover íons amônio e potássio de soluções que o atravessam. Daí em diante, a técnica despertou enorme interesse e foi desenvolvida, atualmente existem diversos materiais trocadores de íons disponíveis e também uma série de aplicações da troca iônica na resolução de problemas de separação e purificação (COLLINS, 2006).

Alguns autores consideram a troca iônica como sendo um caso específico de adsorção. Geankoplis (2003) descreve o processo de adsorção por troca iônica como sendo um processo de adsorção química onde ocorrem reações entre íons presentes na solução e íons da fase sólida insolúvel. Sendo que os íons presentes na solução que reagem com a matriz são repostos pelos íons que estavam ligados à mesma anteriormente, mantendo assim a eletroneutralidade.

Collins e Braga (2006) citam que o mecanismo de troca iônica é governado basicamente por interações eletrostáticas e, dessa forma, o controle do processo pode ser realizado através da manipulação de fatores como força iônica da fase móvel e também através do pH.

Na figura 9 observa-se uma matriz trocadora de cátions onde o processo começa com a matriz em equilíbrio com seu contra íon X^+ . Então uma amostra contendo íons B^+ e C^{++} é aplicada na coluna, esses íons deslocam o íon X^+ e são adsorvidos na matriz. Após a adsorção um eluente Z^+ que tem maior afinidade com a matriz do que B^+ desloca essa espécie que é então eluída, o processo se repete agora com o íon C^{++} sendo deslocado por uma segunda espécie W^+ com maior afinidade pela matriz ou por uma solução do íon Z^+ de maior força iônica capaz de gerar o deslocamento. Dessa maneira, ocorre a separação dos componentes B e C da amostra inicial. Para que o leito possa ser reutilizado a matriz deve ser regenerada com o íon X^+ , para que isso ocorra, uma solução contendo os íons X^+ deve ser passada em um volume de 5 a 10 vezes maior que o volume da coluna, dessa forma os íons X^+ que são fracamente adsorvidos na matriz irão superar a maior afinidade dos outros íons devido à sua maior concentração. (COLLINS, 2006)

Figura 9 - Mecanismo de troca iônica, B e C são íons a ser separados, Z, W e X são eluentes usados.



Fonte: Adaptado de COLLINS, 2006.

As matrizes usadas em cromatografia de troca iônica são porosas, inertes, insolúveis e formam ligações covalentes com os grupos trocadores de íons. Elas são classificadas quanto à natureza podendo ser orgânicas ou inorgânicas e de origem natural ou sintética. Devido à alta eficiência, as matrizes orgânicas sintéticas são as mais usadas. Essas matrizes são obtidas através de reações que geram polímeros

com alto grau de ligações cruzadas. As resinas ácidas, trocadoras de cátions, são obtidas através de reação entre o Poliestireno e o Divinilbenzeno, seguida de sulfonação do anel benzênico. As resinas básicas, trocadoras de ânions seguem o mesmo mecanismo, porém, após a polimerização a matriz é submetida a uma clorometilação e uma reação com uma amina terciária (COLLINS, 2006).

Alguns fatores influenciam a cromatografia por troca iônica, o trocador deve ser escolhido conforme a aplicação, para aplicações preparativas e analíticas existem diferentes tipos de resinas que variam de porosidade. A fase móvel escolhida pode ser ácida, básica ou um tampão, adicionado ou não de algum solvente orgânico ou sal neutro, visando aumentar a seletividade para um determinado composto ou alterar a afinidade do trocador. A eluição em cromatografia por troca iônica pode ser realizada com a própria fase móvel, modo denominado isocrático, ou ainda modificando a força iônica ou pH durante a corrida cromatográfica, modo conhecido como eluição por gradiente (COLLINS, 2006).

2.3.6 Purificação da CPC através de processos de adsorção

Na literatura é possível encontrar diversos trabalhos relacionados à purificação da CPC, em sua maioria esses trabalhos abordam o processo de adsorção da CPC em resinas neutras com as resinas XAD2, 4, 16, resinas do tipo estireno divinilbenzeno. Os resultados desses estudos mostram que essa técnica é possível de ser aplicada na purificação do caldo de cultivo contendo a CPC.

Hicktier e Buchholz (1990) estudaram o perfil de adsorção da CPC em um reator de tanque agitado usando como adsorventes as resinas neutras XAD 4, XAD 1180 e a resina de troca iônica IRA 68. As isotermas foram obtidas através experimentos onde a CPC foi em dissolvida soluções de pH 2,5 a 3,0 em tampão glicina/HCl para as resinas neutras e pH 3,6 em tampão ácido acético para a resina de troca iônica. Os dados foram analisados on line via espectrofotometria em UV/Visível a comprimento de onda de 258 nm. O processo de adsorção da resina foi modelado usando considerações a cerca da cinética do processo. Seus resultados mostraram que o processo de adsorção da CPC nas resinas neutras pôde ser bem descrito por isotermas do tipo BET e o processo em resina de troca iônica é mais

bem ajustado à isoterma do tipo Langmuir. O autor ainda ressalta a maior contribuição dos fatores cinéticos para a modelagem do processo.

Lee, Jung e Moon (1997a) usou as resinas neutras SP280, SP850 e XAD 2 para determinar os parâmetros de equilíbrio e cinéticos no processo de adsorção da CPC. Para determinar as isotermas de adsorção, os autores realizaram experimentos em reatores de tanque agitado e também em colunas de leito fixo. Os autores conseguiram prever o processo de adsorção usando o modelo de Freundlich e o processo de dessorção foi explicado através de um modelo competitivo entre o antibiótico e o álcool isopropílico usado para realizar a eluição. Os modelos foram aplicados com sucesso quando o processo foi realizado em colunas de leito fixo, mostrado pela correlação entre o modelo e as curvas de ruptura obtidas em várias condições de operação.

Lee, Park e Moon, (1997b) reportam em outro trabalho os efeitos de diversas condições de operação sobre o processo de adsorção da CPC em resina SP850. Os parâmetros verificados foram pH, fluxo, temperatura e concentração. Os autores mostram que a adsorção é favorecida pelo aumento do pH e da temperatura. Eles ainda simularam o processo através de modelos de isotermas e constataram que o modelo de Freundlich é o que melhor prevê o mesmo, porém, quando as soluções estão a baixos valores de pH o modelo apresenta desvios consideráveis dos resultados obtidos experimentalmente. Esse fato é atribuído a possíveis espécies iônicas diferentes existentes no meio quando o pH é mantido a baixos valores.

Ramos, Otero e Rodrigues (2004) estudaram o processo de recuperação da CPC usando resina XAD 16. Primeiramente, os autores obtiveram a isoterma de equilíbrio do sistema através de experimentos usando reatores de tanque agitado, a partir daí modelaram as curvas de ruptura para o processo em coluna. Os resultados do processo realizado em coluna foram compatíveis com os resultados previstos pelo modelo desenvolvido. Os autores obtiveram as isotermas de adsorção pelos modelos de Freundlich para concentrações abaixo de 1 g.L^{-1} e pelo modelo de Langmuir para concentrações acima deste valor. A eluição foi realizada com solução de metanol, e o mecanismo atribuído ao processo de dessorção foi a capacidade do metanol deslocar a CPC dos sítios ativos da resina.

Barboza, Hokka e Maugeri, (2002) estudaram o processo de adsorção e dessorção da CPC em resina XAD 2. Os autores mostram que o processo de adsorção pode ser representado pelos modelos de Langmuir, Freundlich e até

mesmo pelo modelo linear. Eles reportam também que a presença de metanol na solução de alimentação afeta negativamente a capacidade da resina de adsorver o antibiótico, além disso, o modelo cinético obtido foi compatível com os dados experimentais obtidos. Os autores ainda mostraram um processo de purificação contínuo da CPC usando dois reatores de tanques agitados interligados, onde no primeiro acontece o ciclo de adsorção e no segundo a dessorção com solução de metanol. Por fim, os autores concluíram que o processo de purificação da CPC em resinas XAD 2 é viável e que fatores como concentração de CPC e temperatura influenciam diretamente no processo de adsorção.

Além da adsorção da CPC em resinas neutras, pode-se realizar o processo através de cromatografia por troca iônica. Na literatura encontram-se citações sobre o uso do processo (SACCO e DELACHERIER, 1981; BAUTISTA *et al*, 2006), porém, as condições nas quais ele é realizado e as informações como um todo estão em sua maioria sobre a forma de patentes (Mc CORNICK e MACK, 1969; VOSER, 1973), esse fato limita acesso ao conhecimento a cerca do tema, além de restringir o acesso ao uso do processo. Isso faz gerar a necessidade de se estudar o processo de adsorção da CPC em resina de troca iônica.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 PREPARO DAS COLUNAS E ENSAIOS CROMATOGRÁFICAS

Para o empacotamento da coluna adicionou-se uma quantidade da resina Amberlite IRA 410 em um béquer, no qual também se adicionou uma quantidade de água deionizada. Em seguida, transferiu-se essa solução para uma bureta de 25 mL com o auxílio de um funil. Durante a transferência usou-se um bastão de vidro para compactação da resina dentro da coluna, de forma que a resina se assentasse homogeneamente, evitando a formação de vazios ou bolhas no interior da coluna. Após esse processo obteve-se uma coluna com leito de 16,5 cm comprimento. A Figura 10 mostra as colunas empacotadas obtidas.

Figura 10 - Colunas usadas no procedimento experimental inicial.



Fonte: O AUTOR, 2013.

Para realizar o condicionamento da resina passou-se pela coluna cerca de 200 mL de água deionizada a fim de realizar a limpeza da mesma, seguido de 200 mL de solução 4,0% m/V de NaCl para garantir a renovação dos sítios ativos da

resina no ciclo do Cloreto e novamente mais 400 mL de água deionizada para remover o excesso de solução salina no leito.

As características da resina Amberlite IRA 410 podem ser consultadas na sessão anexo do presente texto.

Para a preparação das soluções de CPC utilizadas como alimentação, usou-se solução tampão ácido succínico/KOH, (pH 3,6 e força iônica 0,01 M) como diluente. A preparação deste tampão seguiu a metodologia proposta por Perrin (1963), para preparações de tampões para uso em determinações espectrofotométricas. Os valores de pH e força iônica deste tampão foram definidos baseando-se na metodologia experimental proposta por Hicktier e Bucholz (1990) em seu estudo usando a resina de troca aniônica IRA 68 para adsorção de CPC.

A CPC usada nos ensaios foi o sal de zinco da cefalosporina C, grau prático, obtida junto a Sigma Aldrich. Usando-se a solução tampão previamente preparada como diluente, foram preparadas as soluções de CPC dissolvendo-se a massa de CPC pesada referente à concentração desejada em balão volumétrico. As soluções resultantes foram estocadas em geladeira à temperatura de 5°C. As concentrações foram definidas nestes valores devido à escala de leitura do equipamento de espectrofotometria Ultravioleta/Visível.

Partindo-se então para a realização das corridas cromatográficas para obtenção dos perfis de eluição da CPC na coluna empacotada com a resina, primeiramente, foi passada uma alíquota de água deionizada através da coluna para remoção de algum excesso de sal que ainda poderia estar presente na coluna após a etapa de pré-tratamento da resina. Terminada essa etapa, injetou-se a solução de CPC na coluna, o monitoramento foi realizado coletando-se frações de 4 ml em frascos eppendorfs em intervalos de 5 ou 3 minutos. Ao fim da injeção do volume da solução de CPC, outra alíquota de água deionizada foi passada na coluna a fim de retirar a CPC não adsorvida da coluna. Após esse processo prosseguiu-se com a etapa de eluição, com solução de NaCl 4,0% m/V como eluente. Os detalhes dos experimentos são mostrados na tabela 4.

Tabela 4 - Condições adotadas nos experimentos para obtenção dos perfis de eluição da CPC em coluna recheada com a resina IRA 410 exp. 1,2,3.

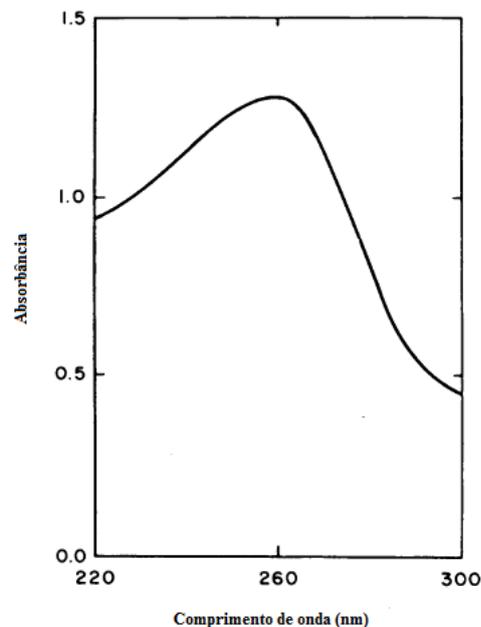
Experimento	Altura do leito	Alimentação	Vazão	Eluição
1	16,5 cm	150 mL de CPC $3,7 \cdot 10^{-2}$ g/L	4 mL/min	Modo isocrático com solução de NaCl 4,0% m/V.
2	16,5 cm	150 mL de CPC $4,4 \cdot 10^{-2}$ g/L	4 mL/min	
3	16,5 cm	150 mL de CPC $5,5 \cdot 10^{-2}$ g/L	4 mL/min	

Fonte: O AUTOR, 2013.

Após o término do ensaio cromatográfico, a resina passou novamente pelo processo de pré-condicionamento para ser reutilizada.

As frações coletadas foram analisadas via espectrofotometria no UV-Visível em $\lambda = 260$ nm. O comprimento de onda foi escolhido com base nas observações de Abraham e Newton (1961) durante seus estudos a cerca da elucidação estrutural da CPC. O espectro de absorção da CPC na região do ultravioleta mostrado na Figura 11 evidencia a forte absorção da molécula neste comprimento de onda. A partir dos valores resultantes registrou-se o gráfico da absorbância em função do tempo de coleta e obteve-se o cromatograma da CPC.

Figura 11 - Espectro de absorbância na região do Ultravioleta da CPC.



Fonte: Adaptado de PIZZANO e VELOZZI, (1974).

Além dos cromatogramas mostrando o perfil de eluição da CPC, foram realizados também experimentos para gerar as curvas de ruptura da CPC na resina. Esses experimentos foram realizados usando-se iguais volumes de solução de CPC de mesma concentração enquanto variava-se a vazão do processo em 3 diferentes valores. Os procedimentos de condicionamento da coluna, injeção da amostra, eluição, coleta das frações e análise dos coletados no UV/Vis foram realizados da mesma forma descrita anteriormente nos experimentos para obtenção do perfil de eluição da CPC. Os detalhes experimentais são mostrados na Tabela 5.

Tabela 5 - Condições experimentais usadas para obtenção das curvas de ruptura da CPC em coluna empacotada com a resina IRA 410 exp. 4,5,6.

Experimento	Altura do leito	Alimentação	Vazão	Eluição
4	16,5 cm	150 mL de CPC $3,7 \cdot 10^{-2}$ g/L	2,8 mL/min	Modo isocrático com solução de NaCl 4,0% m/V.
5	16,5 cm	150 mL de CPC $3,7 \cdot 10^{-2}$ g/L	4,0 mL/min	
6	16,5 cm	150 mL de CPC $3,7 \cdot 10^{-2}$ g/L	5,3 mL/min	

Fonte: O AUTOR, 2013.

Para realizar o experimento de melhoramento do perfil de eluição da CPC, e os experimentos de avaliação da influência do controle de temperatura e de vazão sobre as curvas de ruptura, o arranjo mostrado na Figura 12 foi utilizado. Foi usada uma coluna encamisada acoplada a um banho termostatizado e a uma bomba peristáltica.

Figura 12- Arranjo experimental com controle de temperatura e vazão.



Fonte: O AUTOR, 2014.

Para o experimento de melhoramento de eluição da CPC foi escolhida a concentração de $4,0 \cdot 10^{-2} \text{ g.L}^{-1}$. Já que o perfil obtido nesta concentração se mostrou o melhor nos ensaios anteriores. Em um leito de 10,0 cm de altura com temperatura de 25°C e vazão do sistema de $4,0 \text{ mL.min}^{-1}$. A resina foi pré-condicionada seguindo o processo descrito anteriormente. As condições usadas são apresentadas na Tabela 6.

Tabela 6 - Parâmetros experimentais para melhoramento da eluição da CPC.

Parâmetros	Valor
Solução de CPC	200 mL, $C_0=4,0 \cdot 10^{-2} \text{ g.L}^{-1}$
Temperatura	25°C
Vazão	$4,0 \text{ mL.min}^{-1}$
Altura do leito	10,0 cm
Solução de lavagem	200 mL Água destilada
Solução de eluição	200 mL de NaCl 4% m/V

Fonte: O AUTOR, 2014.

As condições usadas nos experimentos de ruptura com controle de temperatura e vazão podem ser observadas na Tabela 7. Nessa série de experimentos novamente foram avaliados os valores de vazão usados anteriormente, 3,0, 4,0 e 5,0 mL.min^{-1} , mantendo a temperatura constante a 25°C. O valor de concentração de CPC foi escolhido com base nos resultados do experimento de melhoramento do perfil de eluição.

Tabela 7 – Condições usadas para a obtenção das curvas de ruptura com controle de vazão e temperatura.

Experimento	Altura do leito	Alimentação	Vazão	Eluição
7	10 cm	200 mL de CPC $4,0 \cdot 10^{-2} \text{ g/L}$	3,0 mL/min	Modo isocrático com solução de NaCl 4,0% m/V.
8	10 cm	200 mL de CPC $4,0 \cdot 10^{-2} \text{ g/L}$	4,0 mL/min	
9	10 cm	200 mL de CPC $4,0 \cdot 10^{-2} \text{ g/L}$	5,0 mL/min	

Fonte: O AUTOR, 2014.

3.2 CÁLCULOS DOS PARÂMETROS DO PROCESSO EM COLUNA

Os cálculos utilizados para obtenção dos parâmetros da coluna foram feitos seguindo as metodologias propostas por Geankoplis (2003) e Cren *et al* (2009).

A capacidade total do leito é obtida através da equação 5, em que t_t é o tempo referente à capacidade total ou estequiométrica do leito e t_e é o primeiro instante em que C/C_0 é igual a 1.

$$t_t = \int_0^{t_e} \left(1 - \frac{c}{c_0}\right) dt \quad (5)$$

A capacidade usada do leito é obtida no ponto de ruptura quando $C/C_0 = 0,05$ a 0,1, neste trabalho o valor do ponto de ruptura será adotado quando $C/C_0 = 0,1$. E pode ser calculada a partir da equação 6. Sendo t_u é o tempo correspondente ao ponto de ruptura. Idealmente t_u é muito próximo de t_b que é o tempo onde surge o ponto de ruptura.

$$t_u = \int_0^{t_b} \left(1 - \frac{c}{c_0}\right) dt \quad (6)$$

A fração utilizada do leito durante o processo é dada pela razão t_u/t_t . A altura total do leito é dada por H_t . Então a altura do leito utilizada H_u , pode ser obtida através da equação 7.

$$H_u = \frac{t_u}{t_t} \cdot H_t \quad (7)$$

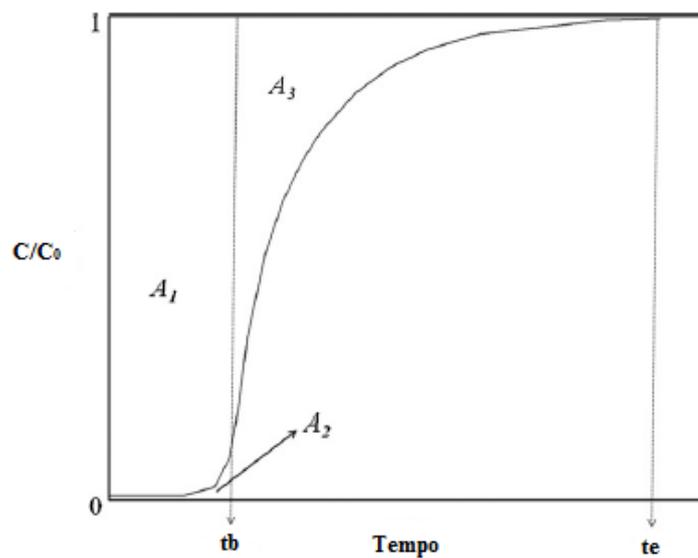
A altura não utilizada H_{un} , é dada por:

$$H_{un} = \left(1 - \frac{t_u}{t_t}\right) \cdot H_t \quad (8)$$

A partir dos valores obtidos da curva de ruptura, podem-se calcular os fatores ε_f , ε_r e P, que são respectivamente, eficiência de uso do leito, eficiência de recuperação do produto e produtividade da coluna. Segundo a metodologia proposta por Cren *et al* (2009), esses parâmetros estão relacionados com a eficiência do processo de recuperação como um todo, para a realização destes cálculos a área da curva de ruptura é dividida em três regiões, sendo que a região A_1 é referente a capacidade do leito utilizada até o ponto de ruptura, e é definida do ponto de entrada da coluna até o ponto de ruptura. A região A_2 é referente à quantidade de soluto que

deixa a coluna sem ser adsorvido até o ponto de ruptura, e por último, A_3 está relacionada à capacidade do leito usada após o ponto de ruptura e é definida do ponto de ruptura até o ponto onde $C/C_0 \sim 1$. A eficiência ϵ_r está relacionada à remoção de soluto, e ϵ_f a eficiência de utilização da resina. A figura 13 mostra a representação gráfica das áreas mencionadas na metodologia anterior.

Figura 13 - Representação da curva de ruptura com a divisão em áreas segundo metodologia proposta por Cren.



Fonte: Adaptado de CREN *et al*, 2009.

As equações 9 a 11 mostram a obtenção das eficiências relacionadas ao processo de coluna.

$$\epsilon_r = \frac{t_u}{t_b} = \frac{A_1}{A_1 + A_2} \quad (9)$$

$$\epsilon_f = \frac{t_u}{t_t} = \frac{A_1}{A_1 + A_3} \quad (10)$$

$$P = \frac{t_t}{t_e} \cdot C_0 \cdot Q \quad (11)$$

Onde Q é a vazão volumétrica do soluto durante a corrida cromatográfica e C_0 é a concentração inicial do soluto.

3.3. CINÉTICA E ISOTERMA DE ADSORÇÃO

Para a obtenção da curva de cinética de adsorção da CPC na resina IRA 410, usou-se uma metodologia baseada no estudo de Barboza e Hokka (2003), em que usou-se uma quantidade de 8,026 g de resina pré-condicionada e 100 mL de uma solução de CPC $4,06 \cdot 10^{-2} \text{ g.L}^{-1}$ com pH ajustado em 3,6, o sistema foi vedado e mantido em agitação constante, a uma temperatura de 30°C. Em intervalos de tempo de 2 minutos foram coletadas alíquotas da solução para análise quantitativa através de espectroscopia no Uv/Vís. O experimento foi conduzido até que o sistema entrasse em equilíbrio e não fosse evidenciada variação no valor da concentração da CPC. Para análise do resultado foi traçado um gráfico de C/Co em função do tempo, onde C é a concentração de CPC em um determinado tempo e Co a concentração inicial de CPC. Depois disso, com o auxílio do programa Origin 8®, os dados foram ajustados a modelos cinéticos de primeira e segunda ordem a fim de saber qual modelo representa melhor a cinética de adsorção da CPC na resina IRA 410. Sendo que as equações usadas como base para a modelagem de primeira ordem (12) e de segunda ordem (13) são mostradas a seguir.

$$\ln [A] = -kt + \ln [A]_0 \quad (12)$$

$$\frac{1}{[A]} = \frac{1}{[A]_0} + kt \quad (13)$$

Para a obtenção da isoterma de adsorção da CPC na resina IRA 410 foram pesadas massas constantes de resina da ordem de 0,5 g em béqueres e quatro soluções de diferentes concentrações de CPC (10,4, 30,2, 44,1 e 58,1mg.L⁻¹) foram colocadas em contato com a resina. O sistema resultante foi vedado, mantido em agitação constante e temperatura de 30°C durante uma hora, tempo necessário para o sistema entrar em equilíbrio. Após este período foram retiradas alíquotas para análise da concentração de equilíbrio na fase líquida, que foram quantificadas por espectroscopia no Uv/Vís. Os experimentos de isoterma cada concentração foi avaliada em triplicata.

O resultado do experimento de isoterma foi analisado através de um gráfico de q^* (Concentração de equilíbrio na fase sólida) em função de Cf^* (concentração de equilíbrio na fase líquida). O Cf^* pode ser obtido diretamente através da leitura em UV/Vís das frações coletadas ao fim do experimento. Já q^* é determinado através da equação 5, mostrada a seguir, sendo Co é a concentração inicial de CPC na fase líquida, m é a massa de resina e Vs é o volume de solução de CPC.

$$q^* = \frac{Co - Cf^*}{m} \cdot Vs \quad (14)$$

Após a obtenção da curva, a mesma foi ajustada ao modelo linear de isoterma com o auxílio do programa Origin 8® e para a obtenção do parâmetro k , importante para descrever o processo de adsorção da CPC na resina, o modelo linear foi escolhido pelo fato de se ter trabalhado com soluções de CPC diluídas.

3.4. SEPARAÇÃO DA CPC E METIONINA

Com o objetivo de separar a CPC de uma solução contendo metionina como contaminante o seguinte experimento foi realizado. Para tanto utilizou-se uma solução de concentração $4,9 \cdot 10^{-2} \text{ g.L}^{-1}$ de CPC e de mesma concentração para a metionina, para simular uma condição extrema em que o contaminante possui concentração igual a da substância de interesse. O caldo teve o pH ajustado em 3,6 com o auxílio do tampão Ác. Succínico/KOH. A coluna cromatográfica foi recheada com a resina IRA410 e pré-condicionada como já descrito anteriormente. O experimento foi realizado a vazão constante de $4,0 \text{ mL.min}^{-1}$ e temperatura de 25°C .

O ensaio cromatográfico foi realizado injetando-se 100 mL de solução contendo a CPC com a metionina, seguida de 15 minutos de lavagem com água. A eluição neste experimento foi realizada no modo gradiente degrau com soluções a 0,1, 0,5, 1,0 e 4,0% m/V de cloreto de sódio. Na literatura (SACCO, DELLACHERIER, 1981) os autores empregam essa metodologia para promover a separação de aminoácidos da CPC em colunas recheadas com resinas neutras modificadas.

A obtenção dos cromatogramas foi realizada de duas formas diferentes. Para a CPC foi realizada a leitura em UV/Visível em comprimento de onda de 260 nm. Os resultados foram lançados em uma curva de calibração previamente obtida e a concentração obtida foi graficada em função do tempo. Nesta metodologia observa-se que a metionina não apresenta absorção significativa neste comprimento de onda e, portanto, não influencia nos valores de concentração de CPC obtidos.

O aminoácido metionina é considerado um contaminante na separação da CPC do caldo fermentativo por isso foi feita a quantificação desse aminoácido por HPLC. As análises foram feitas pelo Grupo de Bioquímica do Departamento de Engenharia Química da UFSCar. Utilizou-se um cromatógrafo com detector de arranjo de diodos (Waters 996 – PDA), uma coluna de fase reversa (μ -Bondapak C18 - 3,9 x 300 mm) e o equipamento foi operado dentro das seguintes condições: vazão de 2,5 mL.min⁻¹, temperatura de 28°C e os picos foram detectados em 220 nm. Cada fração coletada no ensaio em coluna foi injetada no HPLC separadamente e cada cromatograma obtido foi usado para a obtenção do gráfico correspondente ao ensaio completo, lançando os resultados individuais das amostras em função do tempo de coleta.

4. RESULTADOS

4.1 PERFIS DE ELUIÇÃO DA CPC

O objetivo dos experimentos realizados nesta etapa obter o perfil de eluição da CPC na coluna de leito fixo recheada com a resina IRA 410. Essa etapa é necessária para observar as interações entre a CPC e a resina IRA 410. As etapas realizadas durante esse experimento foram:

- A saturação do leito devido à adsorção da CPC;
- A etapa de lavagem do leito onde o excesso de CPC não adsorvida é retirado do leito;
- A etapa de eluição do antibiótico, sendo que é durante essa etapa que a CPC é recuperada e concentrada a partir das frações eluídas onde ela está presente.

A realização do perfil de eluição também é importante pelo fato da necessidade de se aperfeiçoar as etapas descritas anteriormente. Alguns pontos que podem ser ajustados nesta etapa são:

- A quantidade de alimentação usada;
- O tempo de lavagem necessário para eliminação satisfatória de substâncias não adsorvidas no interior do leito;
- As condições de eluição do componente de interesse, onde podem ser feitos testes variando as condições do eluente, como seu pH e/ou concentração de uma corrida para outra, no método de eluição isocrática, ou mesmo variar a concentração durante uma mesma corrida, no método conhecido como eluição por gradiente.

Nos experimentos iniciais os perfis de eluição da CPC foram obtidos em três diferentes valores de concentração, 3,7, 4,4 e $5,5 \cdot 10^{-2}$ g.L⁻¹, respectivamente. A variação da concentração da CPC foi realizada a fim de verificar se essa variável exerce alguma influência no perfil de eluição da molécula no leito recheado com a resina IRA 410. Os cromatogramas obtidos podem ser observados na figura 14. As medidas de absorbância foram realizadas em $\lambda = 260$ nm.

A eluição realizada com solução de NaCl a 4,0% m/V mostrou-se satisfatória, indicando que esta solução pode ser usada com eficiência nesta situação, sem a necessidade do uso da eluição por gradiente que é uma maneira mais trabalhosa de se realizar esta etapa do processo. A escolha deste eletrólito como eluente foi feita com base nas observações de Stables e Briggs (1980) e também no trabalho de Oliveira (2013), neste último a autora utiliza soluções de cloreto de sódio para eluir a Cefamicina C, molécula estruturalmente parecida com a CPC, de uma coluna recheada com resina de troca iônica.

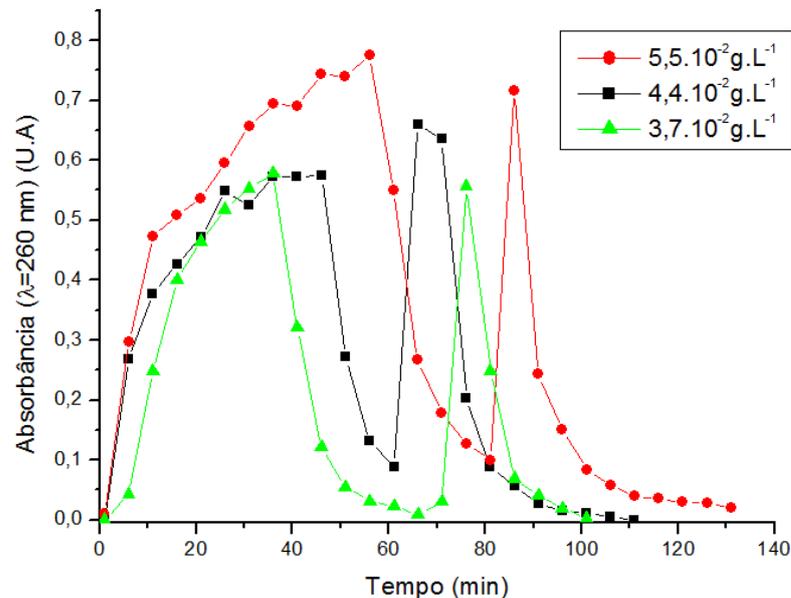
É importante ressaltar que nesta etapa experimental a solução de alimentação era composta somente da CPC e o tampão utilizado, sendo que na presença de outras substâncias contidas no caldo talvez seja necessária a variação das condições de eluição, a fim de obter a separação eficiente entre a CPC e as outras substâncias contidas. A CPC eluiu da mesma forma nas três concentrações estudadas. A concentração da CPC durante os experimentos foi obtida através de uma curva de calibração. A partir dela foi possível determinar a concentração da CPC no ponto máximo de cada pico durante a eluição. Os valores encontrados foram: 3,5, 4,0 e $4,5 \cdot 10^{-2} \text{ g.L}^{-1}$ para as concentrações iniciais de 3,7, 4,4 e $5,5 \cdot 10^{-2} \text{ g.L}^{-1}$, respectivamente. Os máximos valores de absorção encontrados geraram valores de concentração de CPC um pouco abaixo daquela inicialmente injetada. Isso pode ter ocorrido por não ter sido possível coletar uma fração que representasse o máximo de absorção devido ao tempo de coleta das frações previamente definido, ou ainda por parte da CPC ficar fortemente adsorvida à resina mesmo após a aplicação da solução eluente. Pode ser observado também que com o aumento da concentração da solução de alimentação os picos eluídos aumentaram de intensidade como era de se esperar, devido à proporcionalidade entre esses parâmetros quando a quantidade de solução de alimentação injetada é a mesma.

Os cromatogramas mostraram também, em todas as concentrações estudadas, um alargamento da cauda do pico da CPC. Segundo Collins (2006), esse comportamento pode ocorrer devido à uma alta afinidade entre a CPC e a resina, fazendo com que o processo de dessorção não ocorra idealmente. A solução eluente também afeta nessa situação e a modificação de sua força pode melhorar os picos.

Outro ponto que pôde ser observado nos cromatogramas é que a etapa de lavagem após a saturação do leito não foi realizada de forma satisfatória quando a concentração de CPC na solução de alimentação aumentou, visto que houve absorção significativa nas frações coletadas nesta etapa para as concentrações de 4,4 e $5,5 \cdot 10^{-2} \text{g.L}^{-1}$ de CPC. Apenas na concentração mais baixa aplicada, a etapa de lavagem foi realizada de forma eficiente, pois a absorbância atingiu praticamente zero, mostrando que o material não adsorvido que se encontrava na coluna foi totalmente retirado. Esses resultados mostram que é necessário aumentar o tempo de limpeza da coluna após a saturação do leito antes de promover a eluição do composto.

Na Figura 14 é possível observar o comparativo dos cromatogramas da CPC nas três diferentes concentrações estudadas.

Figura 14 – Comparativo dos cromatogramas da CPC nas diferentes concentrações estudadas.



Fonte: O AUTOR, 2013.

Tomando-se por base o máximo de absorbância do pico como referência para se determinar o tempo de retenção, houve variação máxima de cerca de 20 minutos entre as três concentrações estudadas. A existência desta diferença de tempo de retenção não pode ser atribuída à variação da concentração já que se observa que não há relação entre o aumento da concentração e aumento de tempo ou aumento de concentração e diminuição de tempo. O comportamento se mostra

aleatório e pode, talvez, ser atribuído às condições operacionais que não puderam ser controladas, como a temperatura, (Que influencia diretamente no processo de adsorção/dessorção do composto) e a vazão do sistema. A falta de controle dessas variáveis ocorreu, pois, nesta etapa o arranjo experimental usado foi bastante simples, composto apenas por uma bureta usada como leito, sendo a vazão ajustada na torneira da mesma e a temperatura seguindo a temperatura do ambiente, já que a bureta não possuía sistema de controle de temperatura.

Com base nos resultados obtidos partiu-se para realização de modificações no processo a fim de se obter um melhor perfil de eluição da CPC. Nesta etapa, o arranjo experimental usado foi mais complexo, a coluna usada era encamisada e acoplada a um banho termostaticado com controlador eletrônico de temperatura e a vazão do sistema foi controlada com uma bomba peristáltica. As medidas de absorvância foram realizadas em espectrofotômetro UV/Visível em $\lambda = 260 \text{ nm}$.

Os pontos de interesse dessa etapa foram:

- Obter uma lavagem efetiva do leito após a etapa de alimentação e adsorção do antibiótico;
- Um estreitamento do pico de eluido da CPC e também fazer com que a cauda do pico não fosse alargada.

A fim de atingir os objetivos descritos anteriormente, as ações tomadas foram:

- Aumento da quantidade e conseqüentemente do tempo de passagem de água na etapa de lavagem do leito;
- Controle da vazão do sistema com a bomba peristáltica.
- Uso do controle de temperatura para tentar evitar o alargamento do pico.
- E diminuição do tamanho do leito para tentar o estreitamento do pico.

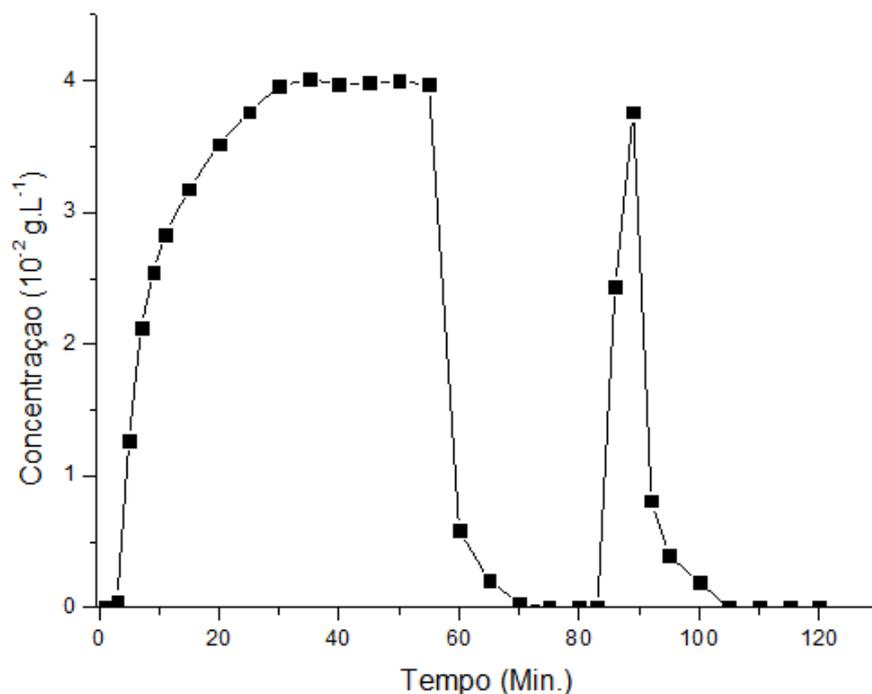
O resultado dessas ações pode ser observado na Figura 15. O perfil de eluição da CPC obtido mostra a região de adsorção atingindo a concentração de alimentação inicial de $4,0 \cdot 10^{-2} \text{ g.L}^{-1}$, seguido de uma etapa de lavagem realizada de forma eficiente devido ao aumento da quantidade de água injetada após a alimentação. O aumento do tempo de lavagem fez com que a concentração de CPC atingisse zero, mostrando que todo o material não adsorvido foi eliminado do interior

do leite. A eliminação de todo material não adsorvido é necessária, pois, o mesmo pode influenciar na etapa posterior de eluição, podendo causar desvios nos resultados de concentração do pico de interesse. A eluição realizada novamente com a solução de cloreto de sódio a 4,0% m/V, mostrou-se satisfatória, sendo que, assim que aplicada já fez com que a CPC fosse desorvida do leite.

A diminuição do tamanho do leito fez com que o pico se tornasse mais estreito, já que inicialmente a CPC era coletada em um intervalo inicial de cerca de mais de 30 minutos e depois dessa ação o pico foi coletado em um intervalo de frações de 20 minutos.

O máximo do pico de CPC eluído teve concentração um pouco abaixo da concentração inicialmente injetada, mostrando que os intervalos de coleta podem ter influenciado novamente, deixando o ponto máximo passar sem ter sido coletado em nenhuma fração, fazendo ocorrer este resultado. Porém, observou-se que o controle de temperatura não fez com que a cauda do pico desaparecesse. Outra maneira de tentar fazer com que o pico tenha melhor aparência seria alterar as características da solução de eluição sendo que os parâmetros que podem ser alterados são o pH e a concentração da mesma.

Figura 15 – Perfil de eluição da CPC após tentativa de melhoria do processo.



4.2 CURVAS DE RUPTURA

Após obter o perfil de eluição da CPC na coluna recheada com a resina IRA 410 e verificar que houve boa interação entre o antibiótico e a resina, partiu-se para a etapa de levantamento das curvas de ruptura. Através das curvas de ruptura é possível se obter uma série de informações acerca do processo, como descrito na seção de metodologia. Além disso, as curvas de ruptura servem também como base para se realizar o aumento de escala do mesmo.

A obtenção das curvas de ruptura para a CPC na coluna recheada com a resina IRA 410 foi feita seguindo o procedimento apresentado anteriormente na seção de metodologia, variando-se a vazão do sistema. A concentração da solução de alimentação foi mantida constante e a eluição após a saturação do leito feita com uma solução de NaCl 4,0% m/V. As frações coletadas foram analisadas por espectrofotometria no UV em $\lambda=260$ nm. As curvas de ruptura foram obtidas com base na metodologia de Geankoplis (2003) onde a razão entre a concentração final sobre a inicial é registrada em função do tempo de corrida.

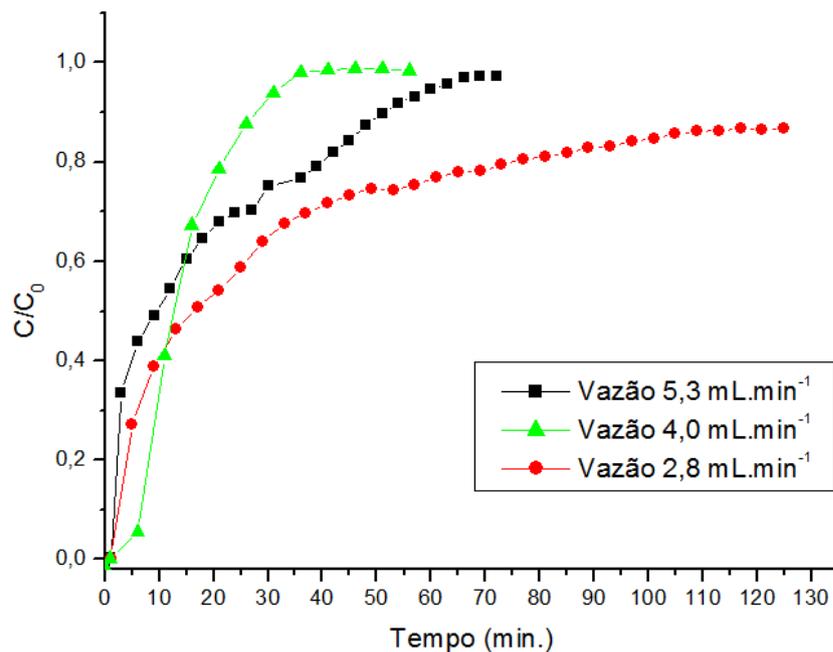
As curvas de ruptura da CPC foram obtidas com sucesso de acordo com a metodologia proposta. O tempo necessário para se atingir o ponto de ruptura onde $C/C_0= 0,1$ foi rápido variando entre 1 a 6 minutos para as vazões utilizadas, significando que a vazão não exerceu influência significativa sobre esse ponto. Para as vazões de 2,8 e 5,3 mL.min⁻¹ o ponto de ruptura ocorreu praticamente ao mesmo tempo entre 1,5 a 2,5 minutos. Já para a vazão de 4,0 mL.min⁻¹, o ponto demorou um pouco mais para ocorrer em cerca de 6 minutos.

O tempo necessário para se obter valores de C/C_0 próximos da unidade foi menor quando a vazão do sistema foi mantida em 4,0 mL.min⁻¹, nas outras vazões o tempo decorrido para que isso ocorresse foi maior, portanto, não houve evidência de uma relação entre vazão de operação do sistema e o tempo de saturação do leito. Outro fato observado é que em nenhuma das vazões foi possível obter $C/C_0 = 1$. Os valores mais próximos encontrados foram, 0,932, 0,984 e 0,868 para os valores de vazão de 5,3, 4,0 e 2,8 mL.min⁻¹, respectivamente. Na vazão de 2,8 mL.min⁻¹, os valores de C/C_0 ficaram bem abaixo da unidade apesar do longo tempo de saturação. Já nas vazões de 5,3 e 4,0 mL.min⁻¹, os valores obtidos foram próximos a 1, sendo que o maior valor de 0,984 foi encontrado para este último valor de vazão,

apesar de que neste valor de vazão o tempo gasto para atingir o ponto de ruptura foi maior do que nos outros ensaios.

Na Figura 16 está ilustrado comparativo entre as curvas de ruptura obtidas nas vazões citadas anteriormente é mostrado.

Figura 16 – Comparativo das curvas de ruptura da CPC nas vazões de 2,8, 4,0 e 5,3 mL.min⁻¹.



As curvas obtidas não seguiram um padrão de formato e também não apresentaram relação entre a variação de vazão e o surgimento do ponto de ruptura, ou relação da vazão com o tempo onde $C/C_0 \sim 1$. Alguns fatores podem ter influenciado neste comportamento aleatório apresentado. Devido a questões de ordem técnica, a temperatura do ambiente em torno da coluna não pôde ser controlada, além disso, os ensaios para cada vazão foram realizados em dias diferentes. A falta de controle da temperatura aliada à variação climática de um dia para o outro e até mesmo a variação ocorrida durante cada experimento pode ter influenciado no comportamento do processo já que a temperatura é um fator determinante em processos de adsorção. Segundo Collins (2006) a variação da temperatura pode influenciar nas interações entre a molécula alvo e o adsorvente e assim alterar o processo de adsorção. Nos trabalhos encontrados na literatura onde são realizados experimentos para observar o comportamento de processos de

adsorção (BARBOZA, HOKKA e MAUGERI, 2002 e BARBOZA, ALMEIDA e HOKKA, 2003) nota-se que a temperatura é sempre controlada durante o experimento. O controle de temperatura durante a cromatografia em coluna pode ser realizada usando colunas encamisadas que permitem a passagem de água com temperatura controlada através de banhos termostatizados, como observado no trabalho de Oliveira (2013). Neste, a autora estuda o processo de purificação da Cefamicina C e busca avaliar o processo de adsorção deste antibiótico em colunas de leito fixo. Barboza, Almeida e Hokka (2003) estudaram o efeito da temperatura no processo de adsorção do ácido clavulânico na resina IRA 400 e mostram que esse fator influencia no processo de dessorção da molécula, que é facilitado pelo aumento da temperatura.

Apesar da não uniformidade apresentada pelas curvas de ruptura obtidas foi possível calcular os parâmetros do processo em coluna para cada vazão segundo a metodologia proposta por Cren *et al* (2009) e por Geankoplis (2003). Os resultados são vistos na Tabela 8.

Tabela 8 – Parâmetros da coluna nas três vazões estudadas.

Parâmetro/Vazão	2,8 mL/min	4,0 mL/min	5,3 mL/min
Tt (min)	25,612	14,812	18,698
Te (min)	61	36	72
Tu (min)	2,3746	6,4757	1,62485
Tb (min)	2,44	6,72	1,65
ϵ_r (%)	97,3	96,4	98,5
ϵ_f (%)	9,3	43,7	8,7
P (mg/min)	0,043	0,061	0,051
Ht (cm)	16,5	16,5	16,5
Hb (cm)	1,53	7,21	1,43
Hu (cm)	14,97	9,29	15,07

Fonte: O AUTOR, 2013.

As eficiências de remoção do soluto (ϵ_r) calculadas atingiram níveis satisfatórios para todas as vazões estudadas. Foram obtidos valores de eficiência acima de 95%, mostrando que a resina foi capaz de reter a CPC da solução de alimentação. Já as eficiências (ϵ_f) relacionadas ao uso da capacidade do leito apresentaram valores baixos. Essas eficiências apresentaram os valores de 9,3, 43,7 e 8,7% para os valores de vazão de 2,8, 4,0 e 5,3 mL.min⁻¹, respectivamente.

Notou-se durante os cálculos que o fator A_3 , obtido segundo a metodologia proposta por Cren *et al* (2009), e usado no cálculo da eficiência de uso do leito, apresentou altos valores para todas as vazões. Esse fator, segundo a autora, está relacionado com a parte do leito que não é usada de forma eficiente, já que parte da adsorção ocorre entre o ponto de ruptura e o ponto onde $C/C_0 \sim 1$. Segundo Geankoplis (2003), essa região da curva, conhecida como zona de transferência de massa, quanto mais estreita e íngreme gera melhor uso do leito. Dessa forma, algum processo paralelo pode estar ocorrendo, como a formação de canais preferenciais, que impedem o uso do leito seja mais eficiente durante o processo.

Comparando com o trabalho de Oliveira (2013) onde a autora usa a mesma metodologia para obter os parâmetros da coluna recheada com a resina Sepharose QXL na purificação da Cefamicina C, molécula bem parecida com a CPC, os resultados mostram tanto a remoção eficiente do soluto, quanto o uso eficiente do leito. Todos os valores obtidos foram acima dos 95%. Nota-se que as curvas de ruptura obtidas pela autora em diferentes vazões mostram perfis semelhantes entre si, e também se mostram bem íngremes e estreitas na região que vai do ponto de ruptura ao valor de $C/C_0 \sim 1$ (zona de transferência de massa). A região referente a A_3 nas curvas da autora exibem baixos valores, refletindo em altas eficiências de uso do leito.

Quanto à altura do leito usado nesse trabalho, observaram-se valores bem baixos em relação à altura total do leito para as três vazões estudadas, e por consequência, os valores de altura não usada do leito foram bem próximos ao valor de altura total do leito. O fato de grande parte da altura do leito não ter sido usado pode indicar que a coluna suporta maior quantidade de CPC. Esses resultados vão de encontro aos baixos valores de eficiência de uso do leito obtidos a partir das áreas das curvas de ruptura.

Apenas na vazão de $4,0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ nota-se o uso de 7,21 cm da altura do leito, eficiência de uso de 43,7% porém, como a forma da curva de ruptura nesta vazão apresentou considerável diferença das demais não é possível concluir se o valor de eficiência de uso do leito e altura de leito usada são devido ao valor da vazão ser o ideal para operação nas condições usadas ou se ocorreu algum erro que levou aos resultados obtidos.

Os tempos t_t e t_e se mostraram muito diferentes para todas as vazões, sendo que a literatura indica que em situações favoráveis t_t e t_e devem exibir valores

próximos. Por outro lado os tempos t_u e t_b , apresentaram valores próximos. Esse comportamento é o encontrado na literatura, que diz que t_u e t_b devem exibir valores próximos (GEANKOPLIS, 2003; OLIVEIRA, 2013).

Os valores das produtividades foram baixos para todas as vazões estudadas. O valor deste parâmetro é diretamente proporcional à relação entre t_t e t_e , como nos experimentos os valores de t_e foram altos em relação aos de t_t , devido a grande zona de transferência de massa exibida nas curvas, as relações entre os tempos para cada vazão foram baixos, acarretando em baixos valores obtidos para as produtividades.

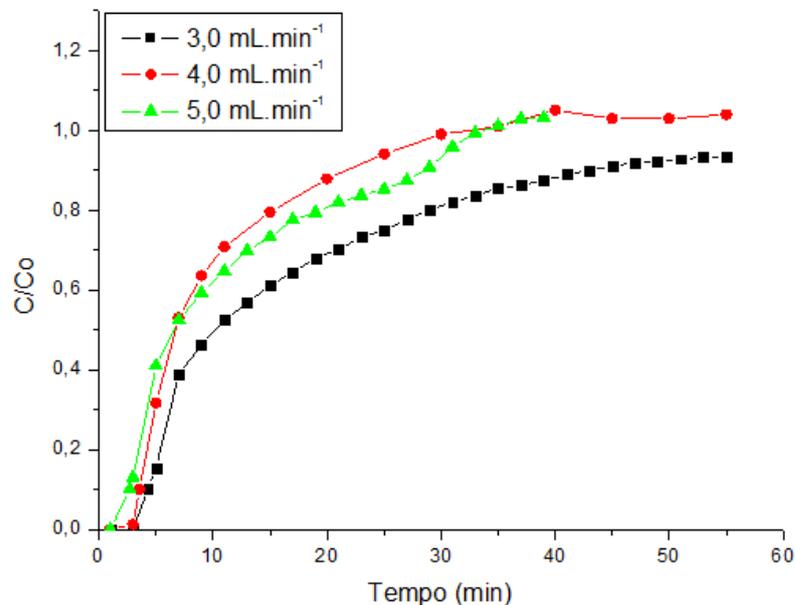
Os valores de eficiência de uso do leito, tamanho usado do leito e o formato da curva obtidos a vazão de $4,0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ foram muito diferentes dos valores obtidos para outras vazões. Isso pode ter sido causado pela falta de controle na temperatura e na vazão dos experimentos, causando diferenças nos resultados obtidos.

A fim de verificar se a temperatura e a vazão influenciaram de alguma forma o processo de adsorção na coluna, os experimentos de obtenção das curvas de ruptura foram repetidos. A temperatura do sistema pode influenciar os processos de adsorção e dessorção da molécula na resina, acelerando ou desacelerando alguma dessas etapas e assim alterar a forma das curvas de ruptura. Barboza, Almeida e Hokka (2003) trabalhando com a adsorção do ácido clavulânico em resinas tipo XAD, observaram que o aumento da temperatura favoreceu a dessorção da molécula da resina. Como no presente trabalho a vazão era controlada manualmente usando uma bureta, pode ter ocorrido algum erro associado a este parâmetro durante a execução do experimento, podendo causar erros principalmente quanto ao surgimento do ponto de ruptura. Os baixos valores de eficiência de uso do leito e altura usada podem estar associados ao uso de um leito muito grande para a concentração de CPC usada.

Nesta nova etapa, a temperatura foi controlada com o auxílio de uma coluna encamisada acoplada a um banho termostaticado. A vazão foi controlada através de uma bomba peristáltica conectada à entrada da coluna. Os experimentos foram realizados nas mesmas condições iniciais, variando a vazão em 3,0, 4,0 e 5,0 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ e mantendo a concentração de CPC a $4,0\cdot 10^{-2} \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ e a temperatura constante 25°C . Outra modificação feita foi diminuir o tamanho do leito, visando aumentar a eficiência de uso do leito e a altura usada de forma eficiente.

Na figura 17, as curvas de ruptura obtidas com o controle de temperatura e vazão podem ser observadas.

Figura 17: Comparativo das curvas de ruptura com controle de temperatura e vazão.



De início pôde ser observado que mesmo com o controle da temperatura e da vazão, as curvas não apresentaram um formato ideal como o visto na literatura (GEANKOPLIS, 2003). Novamente a zona de transferência de massa, região que se estende do ponto de ruptura até C/Co , se mostrou muito extensa e a região associada ao fator A_3 novamente teve altos valores, diferentemente do comportamento ideal. Esse fato indica que os parâmetros não controlados inicialmente não influenciaram no formato não ideal das curvas e que esses formatos obtidos representam realmente o processo de adsorção da CPC na resina IRA 410 nas condições de operação adotadas.

No trabalho de Lee e Moon (1999) os autores trabalham com o efeito do pH na adsorção da CPC na resina neutra SP850. Os autores relatam que adsorção da CPC nesta resina depende fortemente do pH, já que a mudança do mesmo faz com que CPC se apresente de diferentes formas devido a sua natureza anfótera e essas diferentes formas fazem com que a CPC tenha sua afinidade com a resina alterada. Um dos efeitos que chamaram a atenção dos autores é que quando pH é colocado em baixos valores as curvas de ruptura têm suas formas alteradas, se mostrando em formas características de sistemas multicomponentes. Nas curvas obtidas para pH

em torno 3,5 os autores obtiveram curvas de ruptura onde o formato apresenta desvios do formato ideal. Nessas curvas também nota-se que C/C_0 não atinge valor de 1. Os autores atribuem esses comportamentos ao fato de que nem todas as moléculas estão na forma iônica, forma essa favorável para que haja interação com a resina. Este fato também pode explicar o formato das curvas obtidas no presente trabalho e também o fato de nem todas as curvas atingirem o valor de $C/C_0=1$, já que no pH de 3,6 nem toda a CPC está na forma aniônica, o que seria o necessário para ocorrer a adsorção por troca aniônica com a resina IRA410.

Os pontos de ruptura surgiram mais rapidamente de acordo com o aumento da vazão. Este tipo de comportamento é o esperado, já que o aumento da vazão faz com que o mesmo tamanho de leito receba maior volume de solução de alimentação em um mesmo tempo sendo saturado mais rapidamente. Na etapa anterior, o ponto de ruptura referente à vazão de $4,0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ havia saído por último, nesta nova etapa os pontos de ruptura seguiram a tendência normal. No trabalho de Oliveira (2013) em que a autora obtém as curvas de ruptura da Cefamicina C em colunas recheadas com a resina de troca iônica Sephadex QLX, o comportamento do surgimento dos pontos de ruptura também se deu dessa forma, aparecendo em menores tempos com o aumento da vazão.

É possível observar também que apesar do surgimento do ponto de ruptura acontecer mais rapidamente em maiores valores de vazões, as diferenças entre os tempos de surgimento nas três vazões não foram significativas, isso indica que o sistema pode ser operado em qualquer dos três valores sem que haja perdas significativas em termos econômicos, os valores de surgimento dos tempos de ruptura variaram entre 2,5 a 5 minutos. Este comportamento pode ser atribuído ao uso do controle de vazão, já que anteriormente, sem o uso do controle, não foi observada a relação correta entre o aumento da vazão e o surgimento do ponto de ruptura.

Outro ponto observado é que nas vazões de $4,0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ e $5,0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ foi possível atingir $C/C_0=1$, enquanto na vazão de $3,0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ o máximo atingido foi de $C/C_0=0,935$. Esse comportamento também foi observado nas curvas de ruptura obtidas inicialmente, onde nas maiores vazões foi possível obter C/C_0 bem próximos à unidade e na vazão mais baixa C/C_0 atingiu o valor máximo de 0,868. Nesta etapa, os controles de temperatura e vazão possibilitaram que fossem atingidos maiores valores de C/C_0 , já que anteriormente apesar da proximidade dos valores à

unidade, nenhum atingiu o valor de $C/C_0=1$, como ocorreu quando os experimentos foram realizados com esses controles.

A fim de comparação foram calculados também os parâmetros da coluna para os experimentos realizados com os controles de temperatura e vazão. Os resultados são mostrados na Tabela 9.

Tabela 9- Parâmetros da coluna para os experimentos realizados com controle de temperatura e vazão.

Parâmetro/Vazão	3,0 mL/min	4,0 mL/min	5,0 mL/min
Tt (min)	16,424	9,733	12,907
Te (min)	45	30	33
Tu (min)	4,235	3,5167	2,625
Tb (min)	4,30	3,56	2,71
ϵ_r (%)	98,5	98,8	96,9
ϵ_f (%)	25,8	36,1	20,3
P (mg/min)	0,044	0,052	0,078
Ht (cm)	10,0	10,0	10,0
Hb (cm)	2,58	3,61	2,03
Hu (cm)	7,42	6,39	7,97

Fonte: O AUTOR, 2014.

Os cálculos dos parâmetros do processo em coluna para os experimentos com controle de temperatura e vazão mostraram primeiramente que os pares de tempos t_t e t_e novamente apresentaram diferenças significativas em seus valores, mesmo com a diminuição do leito de 16,5 para 10,0 cm. Porém, essa diferença do par de tempos foi menor do que aquela apresentada entre o mesmo par de tempos dos ensaios iniciais. Ou seja, a diminuição do tamanho do leito mostra que há uma tendência na aproximação dos tempos t_t e t_e . O par t_u e t_b manteve o comportamento anterior, de valores bem próximos.

A eficiência ϵ_r relacionada à capacidade do leito de remover o soluto continuou apresentando valores acima de 95%, como anteriormente, sendo que o maior valor atingido foi de 98,8%, quando a vazão do sistema foi de $4,0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$. Os valores obtidos foram satisfatórios, mostrando que a resina IRA 410 interage bem com CPC.

Já a eficiência ϵ_f relacionada ao uso eficiente do leito, continuou apresentando valores considerados baixos. Porém, em comparação aos valores anteriormente obtidos, nota-se que houve um aumento significativo principalmente

entre as vazões de $2,8 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ inicial e $3,0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ neste experimento, saltando de 9,3 para 25,8%, e entre as vazões $5,3 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ inicial e $5,0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ neste experimento, saltando de 8,7 para 20,3%. Para vazão de $4,0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ inicial para $4,0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ deste experimento, houve a redução de valor de 43,7% para 36,1%. Os relativos aumentos podem devem estar associados ao menor tamanho de leito utilizado, já que essa eficiência está diretamente relacionada aos parâmetros de tempos e áreas que foram melhores com a diminuição do leito. O decaimento da eficiência para vazão de $4,0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ mostra que pode realmente ter ocorrido erro no experimento inicial, porém, observa-se também que apesar da suspeita do erro inicial, novamente nesta vazão foi obtido o maior valor de eficiência do uso do leito, indicando também que esta pode ser vazão ideal para trabalhar nas condições deste trabalho.

As alturas usadas dos leitos também foram maiores do que as apresentadas inicialmente quando comparadas aos respectivos pares. Esse fato mostra que a diminuição do tamanho leito surtiu um leve efeito e se mostra como possível caminho para aumentar a eficiência de uso do leito. Observa-se também que o maior valor de uso do leito foi obtido para a vazão de $4,0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, reforçando a ideia de que este valor de vazão pode ser o melhor para operar o sistema.

As produtividades obtidas não foram significativamente maiores do que as obtidas inicialmente, isso se deve ao fato da dependência deste parâmetro da relação entre t_t e t_e , que continuou baixa devido a grande diferença entre esse par de tempos. Observou-se também o aumento proporcional da produtividade de acordo com o aumento da vazão do sistema.

Os resultados obtidos indicam que para os trabalhos futuros a escala da coluna pode ser projetada para diminuir ainda mais o tamanho do leito e quantidade de resina, ou ainda, aumentar a concentração da CPC na solução de alimentação mantendo-se o tamanho do leito, a temperatura constante. E assim identificar se de fato o tamanho do leito é o principal influente nos valores de eficiência de uso do leito e altura usada. Outro ponto que pode ser abordado é se variação de temperatura pode alterar a forma das curvas de ruptura, melhorando-as.

Portanto neste estudo, as ações tomadas a fim de melhorar os parâmetros da coluna foram direcionadas de maneira correta, já que o controle de vazão trouxe uniformidade e comportamento esperado aos tempos de ruptura, e o controle de

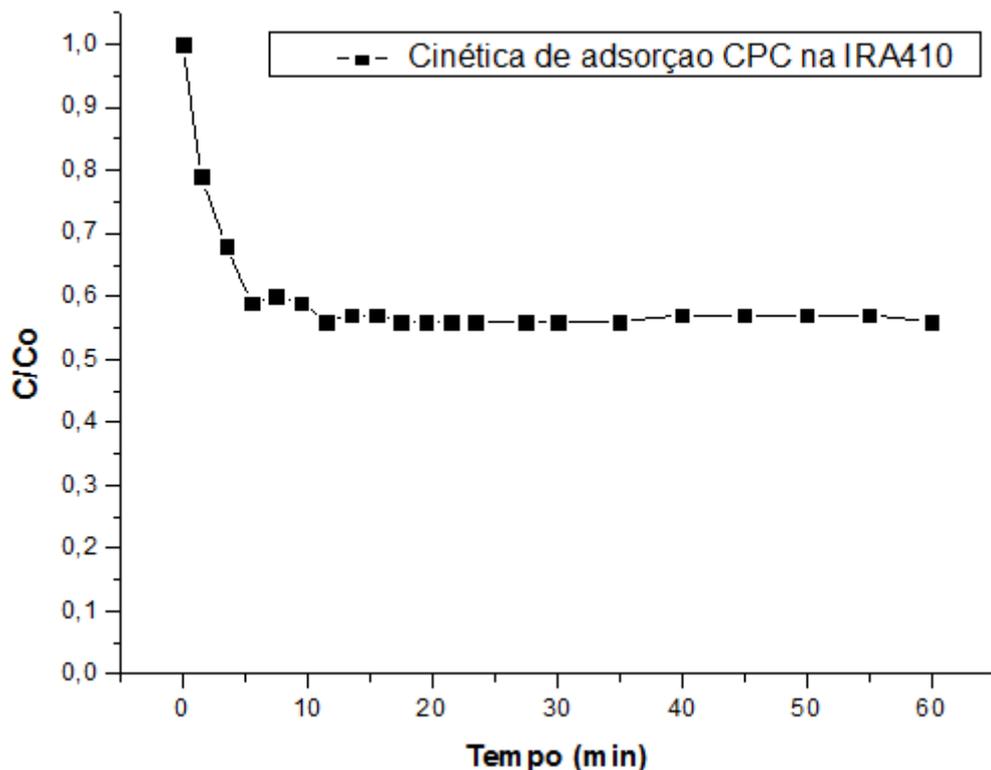
temperatura associado à diminuição do tamanho do leito trouxe aumento no valor de eficiência de uso do leito e altura usada.

4.3. CINÉTICA E ISOTERMA DE ADSORÇÃO

4.3.1 Cinética de adsorção

A fim de estudar o comportamento da CPC na resina IRA410 foram realizados experimentos a cerca da cinética e da isoterma de adsorção. Primeiramente para se obter indicações de como ocorre a variação da concentração de CPC ao longo do tempo e também de possíveis mecanismos foi realizado o experimento de cinética. O resultado obtido é mostrado na Figura 18.

Figura 18 – Cinética de adsorção da CPC na resina IRA410 a 30°C.

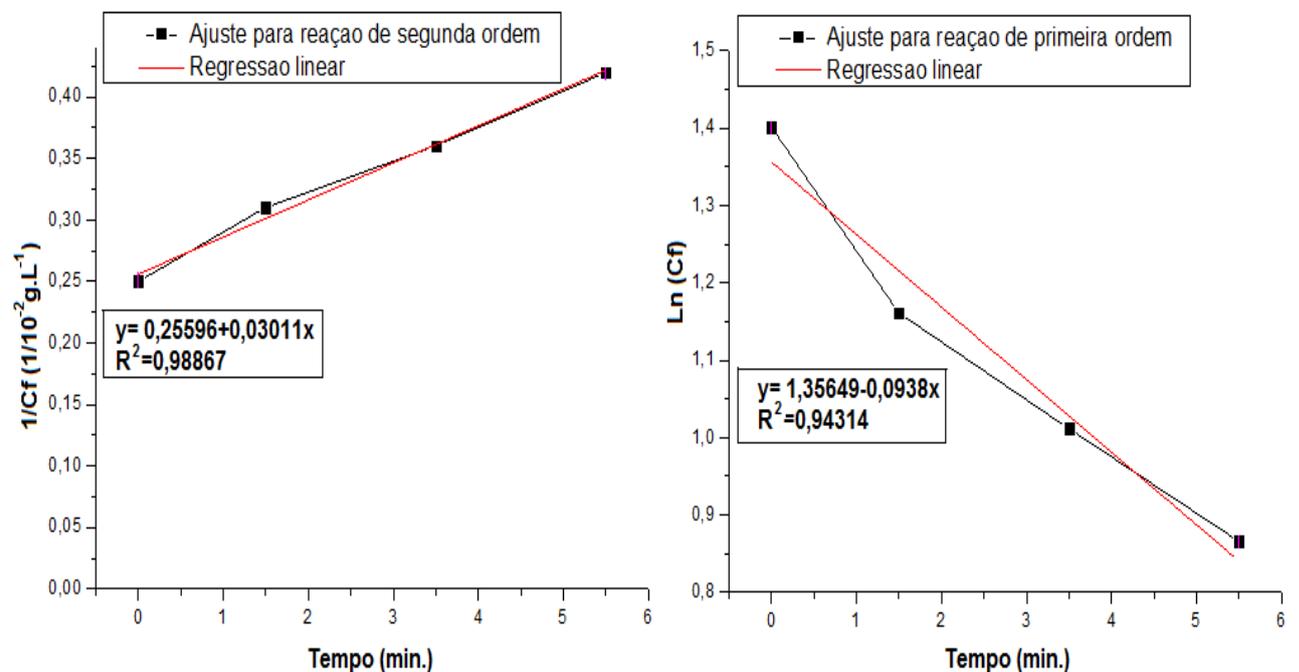


Nota-se primeiramente que o processo entra em equilíbrio em curto período de tempo, já que em cerca de 5,5 minutos já não é possível notar mais variação na relação entre as concentrações inicial e final. Até o fim do experimento em 60 minutos a relação entre as concentrações manteve-se constante, indicando que

realmente o sistema atingiu o equilíbrio. Nota-se também que a resina foi capaz de adsorver aproximadamente 45% da CPC da alimentação inicial, já que no equilíbrio C/Co atingiu o valor de 0,55.

Para obter parâmetros quantitativos e propor algum mecanismo para o processo de adsorção da CPC na resina IRA410 a curva de cinética foi ajustada a modelos de reação de primeira e segunda ordem. Para obtenção do modelo de primeira ordem foi traçado um gráfico do logaritmo natural da concentração final ($\ln(C_f)$) em função do tempo (t), sendo que, o intervalo de tempo usado foi do início do processo até o tempo onde o sistema atinge o equilíbrio em 5,5 minutos. Já para o ajuste de segunda ordem, traçou-se um gráfico de um sobre a concentração final de CPC ($1/C_f$) em função do mesmo intervalo de tempo (t) descrito no ajuste de primeira ordem. A figura 19 a seguir mostra o comportamento cinético ajustado aos dois modelos.

Figura 19 – Ajuste da cinética de adsorção da CPC na resina IRA410 aos modelos de reação de primeira e segunda ordem.



Através do ajuste aos modelos de primeira e segunda ordem pode-se observar que o processo de adsorção da CPC na resina ficou mais bem ajustado ao modelo de segunda ordem, já que o $R^2=0,99$ do modelo de segunda ordem foi maior que o $R^2=0,94$ do modelo de primeira ordem. Este resultado vai de acordo com a

suposição da existência de uma possível “reação” entre a CPC e a resina formando um complexo no sítio ativo da mesma. É possível inferir também que tanto a concentração da CPC quanto a concentração (quantidade) de resina são importantes para o processo de adsorção. A constante K encontrada para o processo de segunda ordem apresentou o valor de $3,011\text{L}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$.

Barboza, Hokka e Maugeri (2002) estudaram o mecanismo de adsorção da CPC na resina XAD2, e apesar das características desta resina serem distintas das características da resina IRA410, os autores também trabalham com a possibilidade do mecanismo de adsorção se basear em uma reação entre a CPC e o sítio ativo da resina, sendo que suas suposições são corroboradas por simulações que se aproximam com bastante fidelidade aos resultados experimentais.

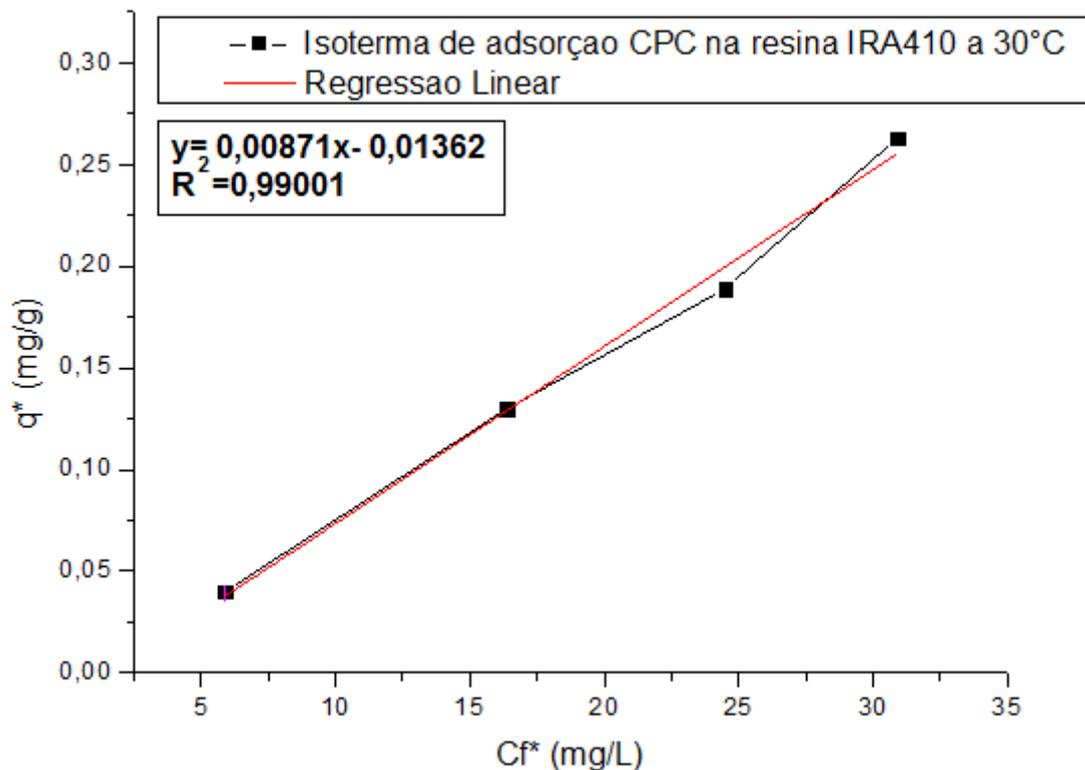
No caso do processo de adsorção da CPC na resina IRA410 pode-se propor então um mecanismo, baseado no mecanismo geral proposto por Barboza, Hokka e Maugeri (2002), também com base nos resultados obtidos nos ajustes cinéticos e levando-se em conta a troca iônica e a dependência das concentrações de CPC e de resina, como mostrado a seguir.



4.3.2. Isoterma de adsorção

Outro ponto investigado no processo de adsorção da CPC na resina IRA410 foi o comportamento da isoterma de adsorção. As isotermas de adsorção da CPC já foram bastante exploradas na literatura, porém, todos os estudos encontrados abordam os processos realizados em resinas neutras como adsorvente. Nesta etapa obteve-se uma isoterma a 30°C do processo de adsorção da CPC na resina IRA410, onde q^* é a concentração de CPC na fase sólida (resina) e C_f^* a concentração de CPC na fase líquida. O resultado é observado na figura 20.

Figura 20 - Isoterma de adsorção da CPC na resina IRA410 a temperatura de 30°C.



Inicialmente é possível observar que a isoterma tem uma tendência linear bastante acentuada, visto que o ajuste linear realizado levou a um $R^2 = 0,99$. Este resultado vai de encontro ao comportamento visto na literatura, já que vários autores destacam que ao se trabalhar em regiões de soluções diluídas o comportamento das isotermas tende a ser descrito pela lei de Henry que é uma relação linear (GEANKOPLIS, 2003, CHAUBAU, 1995). Neste caso as soluções de alimentação usadas foram de concentração 10,4, 30,2, 44,1 e 58,1 mg.L^{-1} , respectivamente, ou seja, soluções de baixa concentração. O valor de K encontrado para o modelo foi de $8,71 \cdot 10^{-3} \text{ L.g}^{-1}$, como não foram encontrados dados sobre o processo de adsorção em resinas trocadoras de íons o K encontrado não pode ser comparado com outros K de mesma natureza. Os valores descritos para outras resinas que adsorvem a CPC, como as neutras XAD2, XAD4 e XAD16 têm isotermas ajustadas por outras relações como Langmuir e Freundlich, fato que dificulta a comparação com o resultado obtido para a IRA410.

Como o R^2 para o ajuste foi igual a 0,99 pode-se concluir que o sistema operado a 30°C e pH de 3,6 na faixa de concentração estudada de 10,4 a 58,1 mg.L^{-1} é bem representado pelo modelo linear. Em trabalhos futuros, as isotermas serão

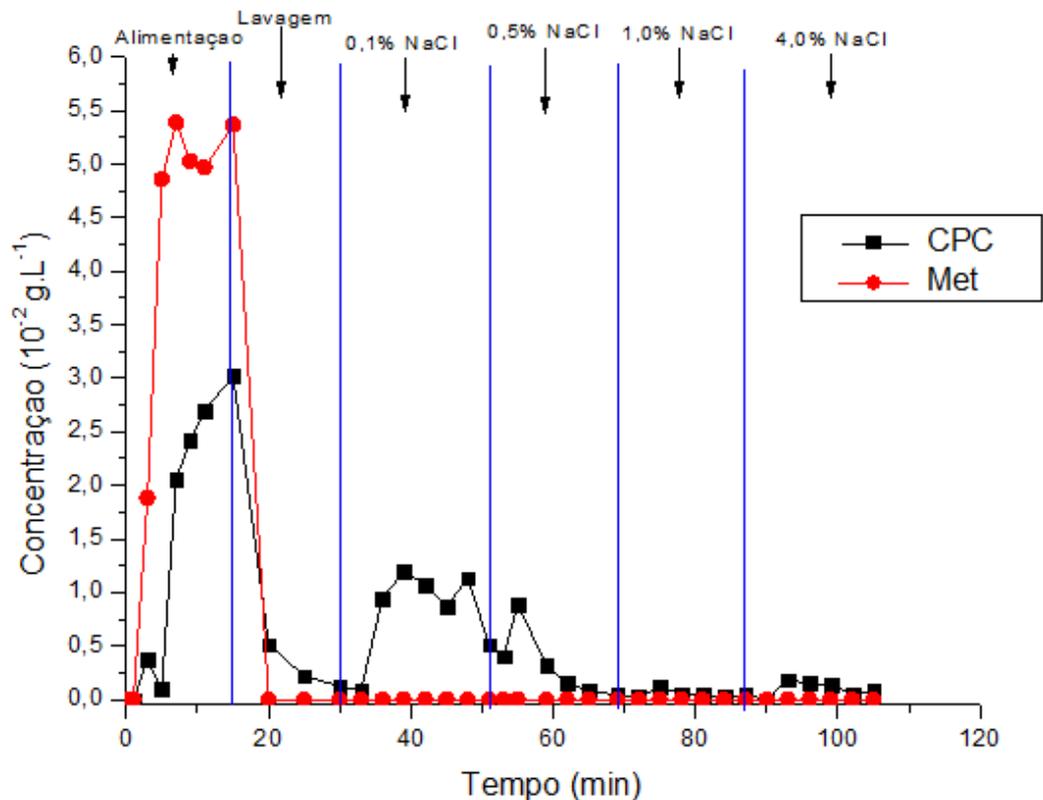
obtidas em diferentes valores de temperatura e também em diferentes valores de pH a fim de coletar mais dados a cerca do processo de adsorção da CPC na resina IRA410 e também em termos de comparação entre os parâmetros.

4.4. SEPARAÇÃO DA CPC E METIONINA

O aminoácido metionina é considerado um potencial contaminante do caldo fermentado de onde a CPC é obtida, já que o mesmo é adicionado na alimentação do sistema e pode não ser totalmente consumido. A fim de verificar a possibilidade de separar a CPC do aminoácido metionina que é um potencial contaminante do caldo fermentado usando a resina IRA410 foi realizado um experimento simulando um caldo contendo a CPC e a metionina. A solução mimética foi preparada a uma concentração de $4,9 \cdot 10^{-2} \text{ g.L}^{-1}$ de CPC e também de metionina e o pH ajustado para 3,6. A solução foi injetada na coluna cromatográfica recheada com a resina IRA410, até que o sistema atingisse o ponto de ruptura. Essa alimentação foi planejada a partir dos dados obtidos anteriormente através das curvas de ruptura. A eluição foi realizada com soluções de cloreto de sódio nas concentrações de 0,1, 0,5, 1,0 e 4,0% m/V, em modo gradiente degrau. A análise das frações coletadas foi realizada através de espectrofotometria no UV/Visível em comprimento de onda de 260 nm. A quantificação da metionina foi realizada através de cromatografia líquida de alta eficiência utilizando-se um Cromatógrafo com detector de arranjo de diodos (Waters 996 – PDA), uma coluna de fase reversa (μ -Bondapak C18 - 3,9 x 300 mm) e o equipamento foi operado dentro das seguintes condições: vazão de $2,5 \text{ mL.min}^{-1}$, temperatura de 28°C e os picos foram detectados em 220 nm.

O cromatograma da separação entre CPC e a metionina é observado na figura 21.

Figura 21- Cromatograma obtido da separação entre CPC e metionina.



Observa-se no cromatograma que na região de alimentação do sistema o planejamento foi executado com sucesso, com a concentração de CPC ultrapassando um pouco o ponto de ruptura da coluna. Este planejamento faz com que a alimentação seja realizada de forma a evitar o desperdício da solução que alimenta o sistema, e que o mesmo seja usado com eficiência.

Na etapa de lavagem também é observado um resultado satisfatório, já que praticamente todo material não adsorvido é lavado da coluna visto que as concentrações das substâncias neste período são iguais a zero para metionina e igual a $0,09 \cdot 10^{-2} \text{ g.L}^{-1}$ para a CPC no momento anterior ao que a eluição é iniciada.

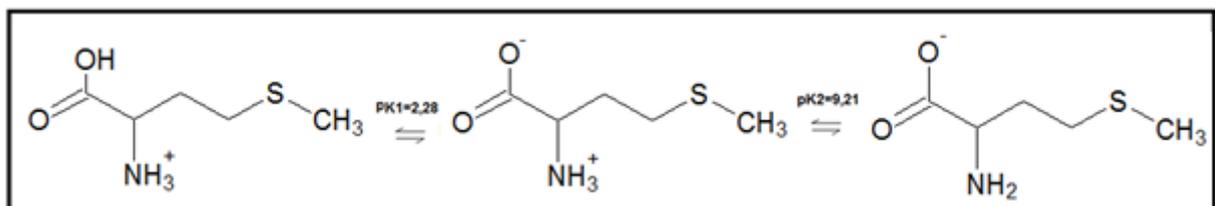
A eluição foi iniciada com a solução de cloreto de sódio a 0,1%, durante o período que essa solução foi aplicada na coluna. Notou-se que a CPC começou a ser removida, atingindo um valor máximo de $1,2 \cdot 10^{-2} \text{ g.L}^{-1}$. Em seguida, a concentração da solução de eluição foi aumentada para 0,5%, neste período a CPC continuou sendo dessorvida da coluna, apresentando um máximo de concentração de $0,89 \cdot 10^{-2} \text{ g.L}^{-1}$. A concentração da solução de eluição foi aumentada mais duas

vezes, para 1,0 e 4,0%, respectivamente, porém não foram observados mais picos referentes à CPC durante o restante da corrida cromatográfica.

O pico referente à CPC obtido mostrou-se largo sem formato definido e saindo durante um grande período de tempo. Esse comportamento se deve ao modo de eluição aplicado que começou com soluções de NaCl diluídas, fazendo com que a CPC fosse se desorvendo da resina aos poucos e de forma lenta, causando o alargamento do pico. Esse modo de eluição se mostrou menos eficiente do que o modo isocrático aplicado nos experimentos de ruptura. O alargamento do pico causa desvantagens econômicas já que o produto de interesse sairá da coluna menos concentrado e distribuído em maior volume de solvente.

Com relação à metionina observou-se que a mesma foi detectada apenas durante a alimentação do sistema e durante a etapa de lavagem. A metionina não foi detectada durante a etapa de eluição. Esse resultado indica que a mesma não foi adsorvida na resina. Este fato pode ser atribuído ao efeito do pH de 3,6 da solução. A metionina possui valores de pK iguais a 2,28 e 9,21 (NELSON, COX, 2000). Abaixo do valor de 2,28 a molécula deste aminoácido encontra-se totalmente protonada (carregada positivamente). Acima do valor de 9,21 a metionina encontra-se totalmente desprotonada (carregada negativamente). Por fim, em valores ao longo do intervalo de 2,28 e 9,21 a metionina encontra-se em um estado onde seu grupamento amino está protonado e o grupo ácido carboxílico desprotonado, desta forma, a molécula apresenta uma carga líquida igual zero. A figura 22, mostra os estados da molécula da metionina de acordo com os valores de pH.

Figura 22: Estados da molécula da metionina de acordo com seu pK.



Fonte: O AUTOR (Desenho no programa Chems sketch®, 2014).

Este fato faz com que, provavelmente, a metionina comporte-se como uma molécula neutra não sendo adsorvida na resina IRA410, passando diretamente pela coluna.

5. CONCLUSÕES

A primeira etapa experimental mostrou que a CPC interagiu bem com a resina. Foi possível obter o perfil de eluição do antibiótico em diferentes concentrações. Os perfis obtidos não mostraram diferenças significativas, mostrando que a resina é capaz de adsorver a CPC em diferentes condições de concentração.

O melhoramento do perfil de eluição foi realizada com sucesso, a CPC adsorveu na resina IRA 410, a etapa de lavagem realizada com maior quantidade de água possibilitou a completa remoção de CPC não adsorvida do leito. A eluição do antibiótico realizada com a solução de cloreto de sódio a 4% m/v se mostrou eficiente, o pico obtido não é largo e elui em um tempo pequeno a partir da aplicação da solução de eluição, sendo assim, viável economicamente. A diminuição do tamanho do leito fez com a CPC fosse recuperada em um menor intervalo de tempo.

Das curvas de ruptura em diferentes vazões foi possível obter os parâmetros relacionados à coluna. Os parâmetros da coluna que foram inicialmente obtidos mostraram altos valores de eficiências com relação à remoção do soluto da solução, porém, as eficiências de uso do leito, as alturas usadas do leito e a produtividade do processo apresentaram valores baixos. Outro fato observado foi que as curvas de ruptura não apresentaram formatos parecidos, sendo que em todas houve a presença de uma área grande entre o ponto de ruptura e o ponto onde a concentração de produto na saída da coluna é próxima a concentração da solução de alimentação inicial, contrariando dessa maneira o perfil dito desejável pela literatura, que diz que a curva deve exibir nessa região um perfil íngreme e estreito que gera o uso eficiente do leito.

Por não ter havido o controle de temperatura e vazão durante a obtenção das primeiras curvas de ruptura, os experimentos foram repetidos controlando a vazão e a temperatura, além de diminuir o tamanho do leito. As ações tomadas fizeram com que os pontos de ruptura seguissem a tendência descrita na literatura onde processos com vazão maior tendem a apresentar o ponto de ruptura em tempos menores daqueles operados com vazões mais baixas, promoveram a aproximação dos tempos t_t e t_e , aumentaram a eficiência de uso do leito, porém os resultados ainda foram baixos. Essas ações levaram também a obtenção de perfis semelhantes para as curvas em todas as vazões estudadas, porém, esses formatos ainda desviaram consideravelmente daqueles descritos na literatura.

Quanto à cinética pode-se concluir que foi o processo foi bem ajustado ao modelo de reação de segunda ordem e, além disso, foi possível atribuir um possível mecanismo de adsorção baseado em suposições descritas na literatura e nos resultados obtidos. A isoterma obtida a 30°C, pH 3,6 e faixa de concentração de 10,4 a 58,1 mg.L⁻¹ de CPC foi bem ajustada ao modelo linear. Este resultado é apoiado pelos resultados descritos na literatura, onde para soluções diluídas as isotermas tendem a seguir a lei de Henry que possui forma linear.

A estratégia usada para separar a CPC do contaminante metionina mostrou-se satisfatória, já que a metionina não interagiu com a resina e saiu da coluna logo que injetada, já a CPC foi adsorvida como previsto anteriormente e, em seguida recuperada através da eluição com soluções de cloreto de sódio. Neste ponto notou-se também que a forma de eluição por gradiente não proporcionou melhorias e o modo de eluição isocrático usado nos ensaios de ruptura mostrou-se mais eficiente já que faz com a CPC seja recuperada em menor tempo e em menos frações, gerando economia de tempo e também de consumíveis para o processo.

Por fim, conclui-se que é viável o uso resina IRA410 como recheio da coluna e o emprego da técnica de cromatografia de troca iônica para purificação da CPC nas condições avaliadas no presente trabalho.

6. TRABALHOS FUTUROS

Futuramente existe a possibilidade de aumentar a complexidade do caldo mimético para verificar as interações entre a resina IRA 410 e os aminoácidos metionina, cisteína e valina, sendo que estes dois últimos também são contaminantes do caldo. Ou ainda, trabalhar com um caldo fermentado original oriundo da produção do antibiótico. Estudar as curvas de ruptura dos compostos a fim de se obter as melhores condições de trabalho para o processo em coluna.

Existe também a possibilidade de estudar o efeito da variação do pH do meio onde a CPC é solubilizada sobre os parâmetros do processo, já que o pH é de extrema importância devido a natureza anfótera da molécula de CPC. Os efeitos do pH sobre o processo cinético e também sobre as isotermas de adsorção da CPC na resina IRA410 também poderão ser estudados.

Por fim, nota-se a possibilidade da aplicação de diferentes resinas para a realização do processo o que seria importante para fins de comparação entre as resinas e poder escolher aquela que melhor atende as condições de trabalho. Obtendo curvas de ruptura e isotermas em diferentes temperaturas e também com maiores concentrações de CPC.

7. REFERÊNCIAS

- ABRHAM, E. P.; NEWTON, G. G. F.. The Structure of Cephalosporin C. **Biochem Journal**. v.79, p.377-393, 1961.
- ADINARAYANA, K. *et al.*. Optimization of Process Parameters for Cephalosporin C Production Under Solid State Fermentation From *Acremonium chrysogenum*. **Process Biochemistry**. v.39, p.171-177, 2003.
- ARAUJO, M. L. G. C.; OLIVEIRA, R. P.; GIORDANO, R. C.; HOKKA, C. O.. Comparative Studies on Cephalosporin C Production Process With Free and Immobilized Cells of *Cephalosporium Acremonium* ATCC 48272. **Chemical Engineering Science**. v.51, p.2835-2840, 1996.
- BAILEY, J. F.; OLLIS, D. F.. Biochemical Engineering Fundamentals, 2nd Edition. **Mc Grall Hill Book Company**, New York, 1986.
- BARBOZA, M.; ALMEIDA, R. M. R. G.; HOKKA, C. O.. Influence of the Temperature on the Kinetics of Adsorption and Desorption of Clavulanic Acid by Ionic Exchange. **Biochemical Engineering Journal**, v.14, p.19-26, 2003.
- BARBOZA, M.; HOKKA, C. O.; MAUGERI, F.. Continuous Cephalosporin C Purification: A Dynamic Modeling and Parameter Validation. **Bioprocess Biosystems Engineering**, v.25, p.193-203, 2002.
- BASCH, J.; CHIANG, S-JD.. Genetic Engineering Approach to Reduce Undesirable Products in Cephalosporin C Fermentation. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**. v.20, p.344–351, 1998.
- BAUTISTA, L. F.; CASILLAS, J. L.; MARTINEZ, M.; ARACIL, J.. Functionalized Adsorbents for the Purification of Cephalosporin C and Deacetylcephalosporin C. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, v.45, p.3230-3236, 2006.
- BEHMER, C. J.; DEMAIN, A. L.. Futher Studies on Carbon Catabolite Regulation of β -Lactam Antibiotic Synthesis in *Cephalosporium acremonium*. **Current Microbiology**. v.8, p.107-114, 1983.
- CALAM, C. T.. Process Development in Antibiotics Fermentation. **Cambridge University Press**. Cap. 1, 1897.
- CHAUBAL, M. V.; PAYNE, G. F.; REYNOLDS, C. H.; ALBRIGHT, R. L.. Equilibria for the adsorption of antibiotics onto neutral polymeric sorbents: Experimental and modeling studies. **Biotechnology and Bioengineering**. v.47, p.215-226, 1995.
- CHU, W. B. Z.; CONSTANTINIDES, A.. Modelling, Optimization and Computer Control of the Cephalosporin C Fermentation Process. **Biotechnology and Bioengineering**. v.32, p.277-288, 1988.

COLLINS, C.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S.. **Fundamentos de Cromatografia**. Ed. UNICAMP. Campinas, 2006.

CREN, E. C.; FILHO; L. C.; SILVA, E. A.; MEIRELLES, A. J. A.. Breakthrough Curves for Oleic Acid Removal from Ethanolic Solutions Using Strong Anion Exchange Resin. **Separation and Purification Technology**. v.69, p.1-6, 2009.

CUNHA, B. C. A.. **Produção De Antibióticos**. Edgard Blucher, Ed. da Universidade de São Paulo, cap. 7, p.113-156, 1975.

DEMAIN, A. L.. Over Production of Microbial Metabolites and Enzymes Due Alteration of Regulation. **Advanced Biochemistry Engineer**. v.1, p.113-142, 1971.

DEMAIN, A. L.; ELANDER, R.P. The β -lactam antibiotics: past, present, and future. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 75, p. 5-19, 1999.

DEMAIN, A. L.; NEWKIRK, J. F.; HENDLIN, D.. Effect of Methionine, Norleucine and Leucine Derivatives on Cephalosporin C Formation in Chemically Defined Media. **Journal of Bacteriology**. v.85, p.339-344, 1963.

DREW, S. W.; DEMAIN; A. L.. Effect of Primally Metabolites on Secondary Metabolism. **Annual Reviews of Microbiology**. v.31, p.343-356, 1977.

ELANDER, R. P.. Production of Beta Lactams Antibiotics. **Applied Microbiology Technology**, v.61, p.385-392, 2003.

FISHER, J. F.; MEROUEH, S. O; MOBASHERY, S.. Bacterial Resistance to β -Lactam Antibiotics: Compelling Opportunism, Compelling Opportunity. **Chemical Reviews**. v.105, p.395-424. 2005.

GEANKOPLIS, C.J.. Transport Process and Unit Operations. Cap. 12, p.697-743, **Prentice-Hall Inc.**, New Jersey, 2003.

HAMAD, B.. The antibiotics market. **Nature Reviews Drug Discovery**, v.9, p.675-676, 2010.

HICKETIER, M.; BUCHHOLZ, K.. Investigation on Cephalosporin C Kinetics and Equilibria. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.32, p.680-685, 1990.

KAMMERER, J.; KAMMERER, D. R.; CARLE, R.. Adsorption and Ion Exchange: Basic Principles and Their Application in Food Processing. **J. Agric. Food Chem.** v.59, p.22-42, 2011.

KEIM, C.; LADISCH, M. R.. Bioseparation of Natural Products. **Progress in Biotechnology**, v.16, p. 15-20, 2000.

LEE, J. W.; JUNG, H. J.; MOON, H.. Effect of Operating Conditions on Adsorption of Cephalosporin C in a Column Adsorber. **Korean Journal of Chemical Engineering**, v.14, p.277-284, 1997.

LEE, J. W.; MOON, H.. Effect of pH On Adsorption of Cephalosporin C by a Nonionic Polymeric Sorbent. **Adsorption**, v.5, p.381, 1999.

LEE, W. J.; PARK, H. C.; MOON, H.. Adsorption and Desorption of Cephalosporin C on Nonionic Polymeric Sorbents. **Separation and Purification Technology**, v.12, p.1-11, 1997.

MATSUMARA, M.; IMANAKA, T.; YOSHIDA, T.; TAGUCHI, H.. Modelling of Cephalosporin C Production and Its Application to Fed-Batch Culture. **Journal of Fermentation Technology**. v.59, p.115-123, 1981.

MCCORNICK, S. L.; MACK, H.. **US Patent**, 3,467,654, 1969.

MUNIZ, C. C.; ZELAYA, T. E. C.; ESQUIVEL; G. R.; FERNÁNDEZ, F. J.. Penicillin and Cephalosporin production: A historical perspective. **Revista Latinoamericana de Microbiologia**, v.49, p.88-98, 2007.

NAJAFPOUR, G. D.. Biochemical Engineer and Biotechnology. 1ª Ed. **Elsevier**, Nova York. Cap.7, p.170-198, 2007.

NELSON, D. L.; COX, M. M.. Lehninger Principles of Biochemistry. 3ª Ed. **W. H. Freeman company**, Nova York. Cap. 5,p. 90,2000.

OLIVEIRA, L. M.. Purificação da Cefamicina C por Processo de Adsorção em Coluna de Leito Fixo. **Tese de Doutorado**. UFSCar: São Carlos, 2013.

OLIVEIRA, J. J. H. L.; GRANATO, A. C.; HIRATA, D. B.; HOKKA, C. O.; BARBOZA, M.. Ácido Clavulânico e Cefamicina C: Uma Perspectiva da Biossíntese, processo de isolamento e mecanismo de ação. **Química Nova**, v.32, p.2142-2150, 2009.

PAGE, M. I.; LAWS, A. P.. The chemical reactivity of the β -Lactams, β -Sulfans and β -Phospholactams. **Tetrahedron**, v.56, p. 5631-5638, 2000.

PERRIN, D. D.. Buffers of Low Ionic Strength for Spectrophotometric pK Determinations. **Aust. J. Chem.**. v.16, p.572-578, 1963.

PESSOA Jr., A.; KILIKIAN, B. V.. Purificação de Produtos Biotecnológicos. Ed. **Manole**, Barueri, 2005.

PIZZANO, M. A.; VELLOZZI, E. M.. Production of Cephalosporin C by *Paecilomyces persicinus* P-10. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v.6, p.447-451, 1974.

RAMOS, A. M., OTERO, M.; RODRIGUES, A. L.. Recovery of Vitamin B12 and Cephalosporin-C From aqueous Solutions by Adsorption on Non-Ionic Polymeric Adsorbents. **Separation and Purification Technology**, v.38, p.85-98, 2004.

SACCO, D.; DELLACHERIER, D.. Liquid Chromatography of Cpehalosporin C and α -Amino Acid Mixtures on Polyfunctional Polystyrene Resins. **Journal of Crhomatography**. v.211, p.79-86, 1981.

SCHLEGEL, H. G.. General Microbiology. **Cambridge University Press**. 7^a ed., p.214, 1990.

SHEN, Y. Q.; HEIM, J.; SOLOMON, N. A.; WOLFE, S.; DEMAINE, A. L.. Repression of β -Lactam Production in *Cephalosporium acremonium* by Nitrogen Sources. **The Journal of Antibiotics**. v.37, p.503-511, 1984.

SILVA, A. S.. The effect of invert sugar on the production of Cephalosporin C in a fed-batch bioreactor. **Brazilian journal of chemical engineering**, v.15, p.320-325, 1998.

SKATRUD, P. L. *et al.*. Use of Recombinant DNA to Improve the Production of Cephalosporin C by *Cephalosporium acremonium*. **Biotechnology**. v.7, p.477-485, 1989.

STABLES, H. C.; BRIGGS, K.. **US Patent**, 4,205,165, 1980.

VOSER, W.. **US Patent**, 3,725,400, 1973.

WEBER, W. J.. Adsorption theory: Concepts and models. In: **Adsorption Technology: A step-by-step to approach to process evaluation and application**. New York: Marcel Dekker, p.1-35, 1985.

ZANCA, D. M.; MARTIN, J. F.. Carbon Catabolite Regulation of the Conversion of Penicillin N Into Cephalosporin C. **The Journal of Antibiotics**. v.36, p.700-708, 1983.

ZHANG, J.; WOLFE, S.; DEMAINE, A. L.. Phosphate Repressible and Inhibitible β -Lactam Synthetases in *Cephalosporium acremonium* Strain C-10. **Applied Microbiology Technology**. v.29, p.848-854, 1988.

ZHOU, W.; RIEGER, K. H.; DORS, M.; SCHUGERL, K.. Influence of Dissolved Oxygen Concentration on the Biosynthesis of Cephalosporin C. **Enzyme Microb. Technol.** v.14, p.848-854, 1992.

ZHOU, W.; RIEGER, K. H.; DORS, M.; SCHUGERL, K.. Influence of Medium Composition on the Cephalosporin C Production With a Highly Productive Strain *Cephalosporium acremonium*. **Journal of Biotechnology**. v.23, p.315-329, 1992.

ANEXO

Propriedades da resina IRA 410.

Propriedade	Especificação
Forma física	Esferas amarelas pálidas
Matriz	Copolímero Estireno Divinilbenzeno
Grupo funcional	Dimetiletanol amômio
Forma iônica trocadora	Cloreto
Capacidade total de troca	> 1,25 eq/L (Forma Cloreto)
Capacidade de retenção de umidade	40 a 51% (Forma Cloreto)
Tamanho de partícula médio	0,6 a 0,75 mm
Inchaço reversível	< 20%

FONTE: SITE SIGMA-ALDRICH, 2013.