

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

CLÓVIS SACARDO DA SILVA

**PURIFICAÇÃO DO ÁCIDO CLAVULÂNICO POR PROCESSO DE
FILTRAÇÃO TANGENCIAL, EXTRAÇÃO POR SISTEMA DE
DUAS FASES AQUOSAS E RE-EXTRAÇÃO COM RESINA DE
TROCA IÔNICA**

SÃO CARLOS – SP

2010

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

**PURIFICAÇÃO DO ÁCIDO CLAVULÂNICO POR PROCESSO DE
FILTRAÇÃO TANGENCIAL, EXTRAÇÃO POR SISTEMA DE
DUAS FASES AQUOSAS E RE-EXTRAÇÃO COM RESINA DE
TROCA IÔNICA**

CLÓVIS SACARDO DA SILVA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de São Carlos como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de doutor em Engenharia Química, área de concentração em Pesquisa e Desenvolvimento de Processos Químicos.

***Orientação:* Prof. Dr. Marlei Barboza Pasotto**

SÃO CARLOS – SP

2010

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária/UFSCar**

S586pa

Silva, Clóvis Sacardo da.

Purificação do ácido clavulânico por processo de filtração tangencial, extração por sistema de duas fases aquosas e re-extração com resina de troca iônica / Clóvis Sacardo da Silva. -- São Carlos : UFSCar, 2010.

194 f.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2010.

1. Engenharia química. 2. Ácido clavulânico. 3. Extração. 4. Filtração. 5. Sistema de duas fases aquosas. I. Título.

CDD: 660 (20^a)

MEMBROS DA BANCA EXAMINADORA DA TESE DE DOUTORADO DE **CLÓVIS SACARDO DA SILVA**, APRESENTADA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS EM 09 DE JUNHO DE 2010.

BANCA EXAMINADORA:



Marlei Barboza Pasotto
orientador, UFSCar



Francisco Maugeri Filho
UNICAMP



Eliana Setusko Kamimura
USP



Álvaro Baptista Netto
Verdartis



Alberto Colli Badino Júnior
UFSCar

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Dr. Marlei Barboza Pasotto pela orientação, confiança e paciência, durante esses quatro anos de trabalho.

À equipe de Fermentação do Professor Dr. Alberto Colli Badino Jr. por possibilitar o desenvolvimento do trabalho com o fornecimento de material para pesquisa.

Em especial aos alunos de iniciação científica Sebastião, Mateus, Guilherme, Eduardo, Verônica, Talyta, Enzo, Mariana, Patrícia e Mayara pela amizade e ajuda indispensável na realização dos experimentos.

Ao técnico Amadeus pela importante ajuda prestada, atenção e paciência, e ao Dr. Álvaro Batista-neto e Eduardo Baston, pelo companheirismo e amizade, e a todos os demais amigos do laboratório, Jaíne, Daniela, Liliane, Luciana, Carol, Juliana, Marcel, Douglas, Ana Maria, Adilson, Luana, Luciana e Eliton.

À CNPq pela bolsa concedida e à FAPESP pelo auxílio financeiro.

SUMÁRIO

	Páginas
SUMÁRIO	i
LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE TABELAS	xvi
NOMENCLATURA	xix
LISTA DE SÍMBOLO	xx
RESUMO	xxii
ABSTRACT	xxiv
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Objetivo geral	4
1.1.1. Objetivos específicos	4
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
2.1. Ácido clavulânico	5
2.1.1. Estabilidade do AC	6
2.2. Processo de Purificação	8
2.3. Separação primária por membranas	9
2.3.1. Microfiltração (MF) e ultrafiltração (UF) de fluxo tangencial	11
2.3.2. Geometria dos módulos de filtração de fluxo tangencial	12
2.3.4. Fluxo de permeado	14
2.3.5. Aplicação do processo de separação por membrana (PSM) na purificação de antibióticos	16
2.4. Sistema de duas fases aquosas – SDFa	19
2.4.1. Diagrama de fases do sistema de duas fases aquosas	20
2.4.2. Fatores que influenciam o SDFa	22
2.4.3. Efeito da massa molecular e concentração	23
2.4.4. Efeito do pH e sais no SDFa	24
2.4.5. Efeito da temperatura no SDFa	25
2.4.6. Aplicação de planejamentos experimentais em SDFa	25

2.4.7. Processos contínuos de SDFa	27
2.4.8. Recuperação e reciclagem das substâncias que formam o SDFa	31
2.5. Processo de cromatografia	32
2.5.1. Resinas de troca iônica	34
2.5.2. Equilíbrio de adsorção	36
2.5.3. Aspectos gerais da adsorção em leito fixo	38
2.5.4. Purificação de ácido clavulânico utilizando troca iônica	39
2.6. Considerações finais	41
3. MATERIAIS E MÉTODOS	43
3.1. Materiais	43
3.1.1. Caldo de ácido clavulânico	43
3.1.2. Resinas de troca iônica	43
3.1.3. Reagentes e compostos utilizados	44
3.1.4. Membranas de microfiltração	44
3.1.5. Membranas de ultrafiltração	44
3.2. Equipamentos	45
3.2.1. Colunas de adsorção	45
3.2.2. Tanques de mistura	45
3.2.3. Cromatógrafo	46
3.2.4. Espectrofotômetro	46
3.2.5. Banho termostaticado	46
3.2.6. Centrifuga refrigerada	46
3.2.7. pHmetro	46
3.2.8. Reômetro	47
3.2.9. Ultrafreezer	47
3.2.10. Câmara de incubação rotatória	47
3.3. Métodos analíticos	47
3.3.1. Determinação da concentração de PEG em soluções	47
3.3.2. Determinação da concentração de fósforo em soluções	49
3.3.3. Determinação da concentração de ácido clavulânico	50
3.3.4. Análise dos contaminantes	51

3.4. Procedimento experimental	52
3.4.1. Unidade e operação da filtração	52
3.4.2. Limpeza da membrana	53
3.4.3. Etapa de extração do AC no sistema de duas fases aquosas PEG/fosfato	53
3.4.4. Obtenção dos intervalos experimentais para a otimização	54
3.4.5. Determinação das linhas de amarração e razão de volume de fase	55
3.4.6. Etapa de re-extração do ácido clavulânico da fase de topo do SDFA por ultrafiltração sem precipitação de sais	57
3.4.7. Etapa de re-extração do ácido clavulânico da fase de topo do SDFA por ultrafiltração com precipitação de sais	57
3.4.8. Purificação/extração do ácido clavulânico provindo das etapas de filtração e SDFA por coluna de leito fixo	57
3.4.9. Modelo matemático do processo de eluição por gradiente	59
3.4.10. Estudos cinéticos de adsorção em tanque agitado	61
3.4.11. Determinação das isotermas	62
3.4.12. Tratamento das resinas	63
3.4.13. Estudo da cinética de degradação	63
3.4.14. Estudo do sistema contínuo de SDFA	63
3.5. Metodologia de análise de resultados	64
3.5.1. Determinação do coeficiente de distribuição, rendimento e fator de purificação.	64
3.5.2. Determinação de fluxo no estado pseudo-estacionário, J_p , e resistividade do gel, I .	65
3.5.3. Caracterização reológica dos fluidos	67
3.5.4. Análise do leito fixo	67
3.5.5. Modelagem do sistema contínuo de SDFA para estágio simples	70
3.6. Programação e estratégia experimental seguida nesta tese	72
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	75
4.1. Caracterização da membrana	75
4.1.1. Experimentos com a membrana de microfiltração 0,2 μm	77

4.1.2. Experimentos com a membrana de ultrafiltração de 50 kDa	81
4.1.3. Experimentos com a membrana de ultrafiltração 3 kDa	83
4.1.4. Perdas de ácido clavulânico	85
4.1.5. Conclusões da etapa de filtração	86
4.2. Seleção dos sistemas de duas fases aquosas	87
4.3. Re-extração do AC da fase de topo do SDFA	87
4.3.1. SDFA para experimentos de re-extração do AC por ultrafiltração	87
4.3.2. Re-extração do AC da fase de topo por ultrafiltração	88
4.3.3. Efeito do etanol na re-extração do AC da fase de topo por ultrafiltração	91
4.4. Re-extração do AC da fase de topo da SDFA por resina de troca iônica	93
4.4.1. Resina Streamline Q XL	94
4.4.2. Estudo da influência da filtração por membranas no processo de purificação do ácido clavulânico por troca iônica	96
4.4.3. Estudo da influência da MF e UF na cinética de adsorção do ácido clavulânico sobre a resina Streamline QXL	100
4.4.4. Isotermas de equilíbrio do AC em relação à resina Streamline QXL	102
4.4.5. Re-extração do AC da fase de topo do SDFA em leito fixo com a resina Amberlite IRA-400Cl	108
4.4.6. Re-extração do AC da fase de topo do SDFA em leito fixo com a resina Streamline Q XL	110
4.4.7. Análise do fósforo e pH durante a re-extração do AC por adsorção	111
4.5. Adsorção e dessorção na re-extração do AC da fase topo do SDFA	114
4.5.1. Influência da temperatura na re-extração do AC da fase de topo do SDFA utilizando a resina Amberlite IRA-400Cl	115
4.5.2. Influência da temperatura na adsorção em tanque agitado na re-extração do AC	117
4.5.3. Análise de fósforo e PEG na adsorção em reator descontínuo na re-extração do AC	121
4.5.4. Resultados experimentais para as isotermas com a resina Amberlite IRA-400Cl na re-extração do AC da fase de topo do SDFA	118
4.6. Efeito do etanol na re-extração do AC da fase de topo por troca iônica	123

4.6.1. Efeito do etanol na re-extração do AC da fase de topo pela resina Amberlite IRA-400Cl	123
4.6.2. Efeito do etanol na cinética de re-extração do AC da fase de topo pela resina Amberlite IRA-400Cl	127
4.6.3. Resultados experimentais para as isotermas com a resina Amberlite IRA-400Cl na re-extração do AC da fase de topo do SDFa após precipitação do sal de fosfato	130
4.6.4. Resultados experimentais com a resina Streamline Q XL na re-extração do AC da fase de topo do SDFa após precipitação do sal de fosfato	132
4.6.5. Resultados experimentais da cinética de adsorção do AC na resina Streamline Q XL após precipitação do sal de fosfato	135
4.6.6. Resultados experimentais para as isotermas com a resina Streamline Q XL na re-extração do AC da fase de topo do SDFa após precipitação do sal de fosfato	138
4.6.7. Análises dos resultados experimentais em coluna de leito fixo com as resinas Amberlite IRA 400-Cl e Streamline Q XL para a re-extração do AC do SDFa	140
4.6.8. Conclusões da etapa de re-extração do AC da fase de topo do SDFa	144
4.6.8.1. Re-extração do AC fase de topo do SDFa por ultrafiltração	144
4.6.8.2. Análise da resina de troca iônica Streamline Q XL na purificação do AC	145
4.6.8.3. Re-extração do AC da fase de topo do SDFa por troca iônica	145
4.7. Otimização dos parâmetros envolvidos na purificação do AC através do sistema de duas fases aquosas	146
4.7.1. Planejamento fatorial 2^5 para SDFa	146
4.7.2. Planejamento fatorial 2^4 para SDFa	150
4.7.3. Conclusões da etapa de otimização do sistema de duas fases aquosas	158
4.8. Análise da variação da concentração do AC na extração por SDFa	158
4.9. Cinética de hidrólise do AC no SDFa	161
4.9.1. Degradação do AC proveniente do produto farmacêutico Clavulin [®] no SDFa	162

4.9.2. Degradação do AC proveniente do caldo fermentado por <i>Streptomyces clavuligerus</i> no SDFA	166
4.9.3. Conclusões das etapas de análise da variação da concentração e da degradação do AC na extração por SDFA	169
4.9.3.1. Conclusões da análise da variação da concentração do AC na extração por SDFA	169
4.9.3.2. Conclusões da análise da degradação do AC na extração por SDFA	170
4.10. Extração do AC em processo contínuo de SDFA	170
4.10.1. Conclusões da etapa da extração do AC em processo contínuo de SDFA	175
5. Conclusão geral do trabalho	176
6. SUGESTÕES	177
6.1. Filtração	177
6.2. Processo de troca iônica	177
6.3. Sistema de duas fases aquosas	178
6.4. Re-extração do AC fase de topo do SDFA	178
7. LISTA DE PUBLICAÇÃO	179
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	181

LISTA DE FIGURAS

	Páginas
Figura 2.1. Estrutura molecular do ácido clavulânico (AC) (BUTTERWORTH, 1984).	5
Figura 2.2. Compostos comerciais de inibidores de β -lactamases (BUYNAK, 2006).	6
Figura 2.3. Ponto passivo de hidrólise na molécula de ácido clavulânico (AC).	6
Figura 2.4. Quadro comparativo entre processos clássicos de separação e os PSM, função das dimensões das espécies a serem separadas. Figura adaptada de HABERT; BORGES; NOBREGA (2006).	10
Figura 2.5. Esquema de uma membrana de filtração tangencial. Figura adaptada da MILLIPORE CORPORATION (2003).	11
Figura 2.6. Representação esquemática de diferentes módulos de filtração tangencial: a) tubular; b) espiral; c) placa. Figura adaptada da MILLIPORE CORPORATION (2003).	13
Figura 2.7. Diagrama de fase retangular.	20
Figura 2.8. Esquema do processo contínuo utilizado por MISTRY <i>et al.</i> (1996).	28
Figura 2.9. Geometrias de entrada do separador horizontal para o SDFa projetado por SALAMANCA <i>et al.</i> (1998): 1) quadrado; 2) quadrado com defletor; 3) cônica.	29
Figura 2.10. Esquema experimental utilizado por CUNHA <i>et al.</i> (1993): (A) alimentação de PEG; (B) alimentação da solução de fosfato; (C) rotâmetro; (D) entrada da fase pesada; (E) retirada da fase de topo; (F) retirada da fase de fundo; (G) entrada da fase leve.	30
Figura 2.11. (a) Perfis de concentração e (b) Curva de saturação para adsorção em leito fixo. Figura adaptada de McCABE; SMITH; HARRIOTT (1993).	39
Figura 3.1. Representação esquemática do módulo de filtração tangencial utilizado para filtração: a) Cartucho: (1) entrada; (2) saída do filtrado; b) Disposição dos tubos na entrada. Figura adaptada da GE HEALTHCARE (2010).	45
Figura 3.2. Formação do complexo de bário e íons de iodeto com polietileno glicol na proporção 1:1 (SKOOG, 1979).	48
Figura 3.3. Curvas de calibração para os PEGs: 6000, 4000, 1000, 600 e 400.	48
Figura 3.4. Reação do ácido clavulânico com imidazol (ERCKES <i>et al.</i> , 1996)	50

Figura 3.5. Esquema de quantificação de AC pelo método de reação de imidazol.	51
Figura 3.6. Aparato experimental utilizado nos ensaios de microfiltração e ultrafiltração. V1 - válvula para regulagem da vazão. V2 - Válvula de segurança (ou alívio) do fabricante Mipel. P1, P2 - Manômetros do tipo Bourdon.	52
Figura 3.7. Esquema dos experimentos para S DFA na primeira etapa.	54
Figura 3.8. Esquema da rotina experimental para sistema de 10g de massa total.	54
Figura 3.9. Típico diagrama de fase. Figura adaptada de ALBERTSSON (1986).	56
Figura 3.10. Esquema do aparato experimental utilizado nas trocas iônicas.	58
Figura 3.11. Esquema do aparato experimental utilizado para troca iônica e eluição com gradiente linear.	58
Figura 3.12. Esquema do processo para a produção de gradientes lineares, côncavos e convexos para modelagem matemática.	59
Figura 3.13. Esquemas de aparelhos simples para a produção de gradientes lineares, côncavos e convexos. No reservatório D1 dos aparelhos, temos a presença de agitador para homogeneização da mistura de dois tampões de diferentes forças iônicas diferentes (SPADARO, 2007a).	61
Figura 3.14. Esquema do processo contínuo para extração do AC.	64
Figura 3.15. Curva típica de saturação de adsorventes em leito fixo (VERMEULEN; ANDERSON, 1993).	68
Figura 3.16. Esquema do fluxo da extração contínua de estágio simples do S DFA.	70
Figura 3.17. Diagrama das etapas de estudos experimentais desenvolvido neste trabalho.	74
Figura 4.1. Linearização da Equação 3.23 e seu ajuste em relação aos dados experimentais dos fluxos de permeados das membranas de polisulfona, a 25° C. a) MF de 0,2 μm e 0,1 μm ; b) UF de 50 kDa; c) UF de 30 kDa e 3 kDa; d) UF de 1 kDa.	76
Figura 4.2. Fluxo de permeado da MF de 0,2 μm com o tempo de filtração em diferentes condições operacionais para os experimentos M1, M2, M3.	77
Figura 4.3. Fluxo de permeado da MF de 0,2 μm com o tempo de filtração em diferentes condições operacionais para os experimentos M4, M5, M6.	78
Figura 4.4. A resistividade da camada de gel (I) em função do tempo dos experimentos M1, M2 e M3.	79

Figura 4.5. A resistividade da camada de gel (I) em função do tempo dos experimentos M4, M5 e M6.	80
Figura 4.6. Fluxo de permeado da UF de 50 kDa com o tempo de filtração dos experimentos U1, U2 e U3 para diferentes pressões transmembrana.	82
Figura 4.7. A resistividade da camada de gel (I) em função do tempo dos experimentos U1, U2 e U3.	83
Figura 4.8. Fluxo de permeado da UF de 3 kDa com o tempo de filtração dos experimentos U4, U5 e U6 para diferentes pressões transmembrana.	84
Figura 4.9. A resistividade da camada de gel (I) em função do tempo dos experimentos U4, U5 e U6.	85
Figura 4.10. Fluxo de permeado da re-extração do AC em função do tempo de filtração para diferentes PEGs, a temperatura de 11° C.	90
Figura 4.11. A resistividade da camada de gel (I) da re-extração do AC em função do tempo, a temperatura de 11° C: (a) PEG 1000, 600 e 400; b) PEG 4000.	90
Figura 4.12. Fluxo de permeado da re-extração do AC para diferentes PEGs em função do tempo na presença do etanol e a temperatura de 11° C: (a) PEG 1000, 600 e 400; b) PEG 4000.	92
Figura 4.13. A resistividade da camada de gel (I) da re-extração do AC em função do tempo na presença do etanol e a temperatura de 11° C: (a) PEG 1000, 600 e 400; b) PEG 4000.	97
Figura 4.14. Experimento S1 em coluna de leito fixo com resina Streamline Q XL, a temperatura de 20° C, pH 6,2 e $C_{AC, amostra} = 737 \text{ mg.L}^{-1}$.	95
Figura 4.15. Experimento S2 em coluna de leito fixo com resina Streamline Q XL, a temperatura de 20° C, pH 6,2 e $C_{AC, amostra} = 667 \text{ mg.L}^{-1}$.	96
Figura 4.16. Evolução da cromatografia do AC utilizando do caldo pré-tratado com a membrana de MF de 0,2 μm em coluna de leito fixo preenchida com resina Streamline Q XL, a temperatura de 20° C.	97
Figura 4.17. Evolução da cromatografia do AC utilizando caldo pré-tratado com a membrana de MF de 0,1 μm em coluna de leito fixo preenchida com resina Streamline Q XL, na temperatura de 20° C.	98
Figura 4.18. Evolução da cromatografia do AC utilizando caldo pré-tratado com a membrana de UF de 50 kDa em coluna de leito fixo preenchida com resina Streamline Q XL, a temperatura de 20° C.	99

- Figura 4.19. Evolução da cromatografia do AC utilizando caldo pré-tratado com a membrana de UF de 3 kDa em coluna de leito fixo preenchida com resina Streamline Q XL, a temperatura de 20° C. 99
- Figura 4.20. Resultados dos estudos cinéticos do AC presente em caldos pré-tratados com membranas de MF e UF em resina Streamline Q XL, a temperatura de 20° C: a) adsorção; b) eluição. 101
- Figura 4.21. Resultados dos estudos cinéticos dos contaminantes presente em caldos contendo AC pré-tratados com membranas de MF e UF na resina Streamline Q XL, a temperatura de 20° C; a) adsorção, b) eluição. 101
- Figura 4.22. Isoterma de equilíbrio de adsorção do ácido clavulânico presente em caldo pré-tratado com membrana de MF de 0,2 µm, a temperatura de 20° C. 102
- Figura 4.23. Isoterma de equilíbrio de adsorção do ácido clavulânico presente em caldo pré-tratado com membrana de MF de 0,1 µm, a temperatura de 20° C. 103
- Figura 4.24. Isoterma de equilíbrio de adsorção do ácido clavulânico presente em caldo pré-tratado com membrana de UF de 50 kDa, a temperatura de 20° C. 105
- Figura 4.25. Isoterma de equilíbrio de adsorção do ácido clavulânico presente em caldo pré-tratado com membrana de UF de 3 kDa, a temperatura de 20° C. 105
- Figura 4.26. Isoterma de equilíbrio de adsorção do AC obtido a partir do produto farmacêutico Clavulin[®], a temperatura de 20° C. 106
- Figura 4.27. Re-extração de AC da fase de topo PEG 6000 com a resina Amberlite IRA-400Cl, a 20° C, pH 6,2 e $C_{AC, topo} = 207,4 \text{ mg.L}^{-1}$. 109
- Figura 4.28. Re-extração de AC da fase de topo PEG 600 com a resina Amberlite IRA-400Cl, a 20° C, pH 6,2 e $C_{AC, topo} = 113,9 \text{ mg.L}^{-1}$. 110
- Figura 4.29. Re-extração de AC da fase de topo PEG 600 com a resina Streamline Q XL, a 20° C, pH 6,2 e $C_{AC, topo} = 113,9 \text{ mg.L}^{-1}$. 111
- Figura 4.30. Evolução do pH e da adsorção do fósforo na re-extração do AC da fase PEG-600 pela resina Amberlite IRA-400Cl, a temperatura de 20° C: AC (●), fósforo (Δ), pH (■). 113
- Figura 4.31. Evolução do pH e adsorção do fósforo na re-extração do AC da fase PEG-600 pela resina Streamline Q XL, a temperatura de 20° C: AC (●), fósforo (Δ), pH (■). 114

- Figura 4.32. Curvas de saturação da coluna de leito fixo com resina Amberlite IRA-400Cl pelo AC presente na fase rica em PEG 600 para diferentes temperaturas. 116
- Figura 4.33. Curvas de eluição do AC adsorvido na resina Amberlite IRA-400Cl no processo de coluna de leito fixo para diferentes temperaturas. 117
- Figura 4.34. Curvas de adsorção do AC na resina Amberlite IRA-400Cl da fase PEG 600 em tanque agitado, para diferentes temperaturas. AC: 10° C (■), 20° C (●), 30° C (▲); pH: 10° C (□), 20° C (○), 30° C (△). 119
- Figura 4.35. Curvas de eluição do AC da resina Amberlite IRA-400Cl para fase PEG 600 em tanque agitado, para diferentes temperaturas: AC: 10° C (■), 20° C (●), 30° C (▲); pH: 10° C (□), 20° C (○), 30° C (△). 119
- Figura 4.36. Curvas da etapa adsorção do PEG 600 e fósforo para diferentes temperaturas em tanque agitado. PEG 600: 10° C (■), 20° C (●), 30° C (▲); Fósforo: 10° C (□), 20° C (○), 30° C (△). 120
- Figura 4.37. Curvas da etapa de eluição do PEG 600 e fósforo para diferentes temperaturas em tanque agitado. PEG 600: 10° C (■), 20° C (●), 30° C (▲); Fósforo: 10° C (□), 20° C (○), 30° C (△). 121
- Figura 4.38. Isoterma de equilíbrio de adsorção do AC presente na fase de topo do SDFa composto por PEG 600 e fosfato, na resina Amberlite IRA-400Cl para diferentes temperaturas. 122
- Figura 4.39. Curvas de saturação e eluição do AC presente na solução PEG/etanol na coluna de leito fixo com resina Amberlite IRA-400Cl para diferentes temperaturas. 125
- Figura 4.40. Evolução do pH durante re-extração do AC da solução PEG/etanol pela resina Amberlite IRA-400Cl para diferentes temperaturas. AC: 10° C (■), 20° C (●), 30° C (▲); pH: 10° C (□), 20° C (○), 30° C (△). 126
- Figura 4.41. Evolução da concentração de PEG e do fósforo na re-extração do AC da solução fase de PEG/etanol em coluna de leito fixo com resina Amberlite IRA-400Cl, a temperatura de 20° C; $C_{Fos, etanol} = 1,1 \text{ g.L}^{-1}$. 127
- Figura 4.42. Curvas da etapa adsorção do AC presente na solução PEG/etanol na resina Amberlite IRA-400Cl para diferentes temperaturas; AC: 10° C (■), 20° C (●), 30° C (▲); pH: 10° C (□), 20° C (○), 30° C (△). 128

- Figura 4.43. Curvas da etapa eluição do AC presente na solução PEG/etanol, na resina Amberlite IRA-400Cl para diferentes temperaturas; AC: 10° C (■), 20° C (●), 30° C (▲); pH: 10° C (□), 20° C (○), 30° C (△). 129
- Figura 4.44. Curvas da etapa adsorção e eluição de PEG, fosfato e AC da solução PEG/etanol, na resina Amberlite IRA-400Cl, a temperatura de 20° C. a) adsorção; b) eluição. 130
- Figura 4.45. Isoterma de equilíbrio de adsorção do AC presente na fase de topo do SDFa após a precipitação do sal fosfato por etanol, na resina Amberlite IRA 400-Cl, nas temperaturas de 20 e 30° C. 131
- Figura 4.46. Curvas de saturação e eluição do AC presente na solução PEG/etanol na coluna de leito fixo com resina Streamline Q XL para diferentes temperaturas. 133
- Figura 4.47. Evolução do pH durante re-extração do AC da solução PEG/etanol pela resina Streamline Q XL para diferentes temperaturas. AC: 10° C (■), 20° C (●), 30° C (▲); pH: 10° C (□), 20° C (○), 30° C (△). 134
- Figura 4.48. Concentração de PEG e do fósforo na re-extração do AC da solução PEG/etanol em coluna de leito fixo com a resina Streamline Q XL, a temperatura de 20° C e $C_{Fos.,etanol} = 0,75 \text{ g.L}^{-1}$. 134
- Figura 4.49. Curvas da etapa adsorção do AC presente na solução PEG/etanol na resina Streamline Q XL em tanque agitado, para diferentes temperaturas. AC: 10° C (■), 20° C (●), 30° C (▲); pH: 10° C (□), 20° C (○), 30° C (△). 136
- Figura 4.50. Curvas da etapa eluição do AC presente na solução PEG/etanol, para resina Streamline Q XL em tanque agitado, para diferentes temperaturas; AC: 10° C (■), 20° C (●), 30° C (▲); pH: 10° C (□), 20° C (○), 30° C (△). 137
- Figura 4.51. Curvas da etapa adsorção e eluição de PEG, fosfato e AC da solução PEG/etanol para resina Streamline Q XL em tanque agitado, a temperatura de 20° C. a) adsorção; b) eluição. 138
- Figura 4.52. Isoterma de equilíbrio de adsorção do AC presente na fase de topo do SDFa após a precipitação do sal fosfato por etanol, na resina Streamline Q XL, nas temperaturas de 20 e 30° C. 139
- Figura 4.53. Curvas de ruptura, para a re-extração do AC do PEG, sem precipitação do fosfato, e seus respectivos ajustes para coluna com a resina Amberlite IRA 400-Cl, submetida a diferentes temperaturas e vazão de 6 mL.min^{-1} . 143

Figura 4.54. Curvas de ruptura, para a re-extração do AC do PEG, com fosfato precipitado, e seus respectivos ajustes para coluna com a resina Amberlite IRA 400-Cl, submetida a diferentes temperaturas e vazão de 5,5 mL.min ⁻¹ .	143
Figura 4.55. Curvas de ruptura, para a re-extração do AC do PEG com fosfato precipitado, e seus respectivos ajustes para coluna com a resina Streamline QXL, submetida a diferentes temperaturas e vazão de 5,5 mL.min ⁻¹ .	144
Figura 4.56. Curva de contorno para o <i>K</i> em função de mPEG e pH.	153
Figura 4.57. Curva de contorno para o <i>K</i> em função de mPEG e rTLL.	154
Figura 4.58. Curva de contorno para o <i>K</i> para ácido clavulânico por S DFA: mPEG vs TLL.	154
Figura 4.59. Curva de contorno para o <i>R</i> (%) em função de mPEG e pH.	155
Figura 4.60. Curva de contorno para o <i>R</i> (%) em função de mPEG e rTLL.	155
Figura 4.61. Curva de contorno para o <i>R</i> (%) em função de mPEG e TLL.	156
Figura 4.62. Curva de contorno para o <i>FP</i> em função de mPEG e pH.	156
Figura 4.63. Curva de contorno para o <i>FP</i> em função de mPEG e rTLL.	157
Figura 4.64. Curva de contorno para o <i>FP</i> em função de mPEG e TLL.	157
Figura 4.65. Efeito da concentração do AC no coeficiente de partição do AC em S DFA composto de PEG e sais fosfato de potássio, a temperatura de 25° C.	159
Figura 4.66. Relação entre o aumento da concentração de AC e quantidade de mol de PEG entre fase de topo e fundo, a temperatura de 25° C. a) Fase de topo; b) Fase de fundo.	161
Figura 4.67. Hidrólise do AC proveniente do produto farmacêutico Clavulin [®] para o PEG 400, a temperatura de 20° C e diferentes pHs: a) Fase de topo; b) Fase de fundo.	163
Figura 4.68. Hidrólise do AC proveniente do produto farmacêutico Clavulin [®] para o PEG 600, na temperatura de 20° C e diferentes pHs: a) Fase de topo; b) Fase de fundo.	163
Figura 4.69. Hidrólise do AC proveniente do produto farmacêutico Clavulin [®] para o PEG 1000, a temperatura de 20° C e diferentes pHs: a) Fase de topo; b) Fase de fundo.	163
Figura 4.70. Hidrólise do AC proveniente do produto farmacêutico Clavulin [®] para o PEG 4000, a temperatura de 20° C e diferentes pHs: a) Fase de topo; b) Fase de fundo.	164

Figura 4.71. Hidrólise do AC proveniente do produto farmacêutico Clavulin [®] para o PEG 6000, a temperatura de 20° C e diferentes pHs: a) Fase de topo; b) Fase de fundo.	164
Figura 4.72. Efeito do pH na constante da taxa degradação do AC proveniente do produto farmacêutico Clavulin [®] no SDFA, a temperatura de 20° C em comparação com os resultados obtidos por BERSANETTI <i>et al.</i> (2005).	165
Figura 4.73. Hidrólise do AC proveniente do caldo pré-tratado para o PEG 400, a temperatura de 20° C e diferentes pHs: a) Fase de topo; b) Fase de fundo.	166
Figura 4.74. Hidrólise do AC proveniente caldo pré-tratado para o PEG 600, a temperatura de 20° C e diferentes pHs: a) Fase de topo; b) Fase de fundo.	167
Figura 4.75. Hidrólise do AC proveniente do caldo pré-tratado para o PEG 1000, a temperatura de 20° C e diferentes pHs: a) Fase de topo; b) Fase de fundo.	167
Figura 4.76. Hidrólise do AC proveniente do caldo pré-tratado para o PEG 4000, a temperatura de 20° C e diferentes pHs: a) Fase de topo; b) Fase de fundo.	167
Figura 4.77. Hidrólise do AC proveniente do caldo pré-tratado para o PEG 6000, a temperatura de 20° C e diferentes pHs: a) Fase de topo; b) Fase de fundo.	168
Figura 4.78. Efeito do pH na constante da taxa degradação do AC proveniente do caldo pré-tratado no SDFA, a temperatura de 20° C em comparação com os resultados obtidos por BERSANETTI <i>et al.</i> (2005).	169
Figura 4.79. Coeficiente de partição do AC para SDFA em processo contínuo com AC proveniente do Clavulin [®] .	171
Figura 4.80. Concentração de PEG na fase de topo e fundo para o processo contínuo de SDFA na extração de AC da solução de Clavulin [®] : a) Fase de topo; b) Fase de fundo.	172
Figura 4.81. Concentração de sal de fosfato na fase de topo e fundo para o processo contínuo de SDFA na extração de AC da solução de Clavulin [®] : a) Fase de topo; b) Fase de fundo.	172
Figura 4.82. Variação do K e FP para o processo contínuo caldo de AC em relação ao tempo.	173
Figura 4.83. Concentração de PEG na fase de topo e fundo para o processo contínuo de SDFA na extração de AC do caldo pré-tratado: a) Fase de topo; b) Fase de fundo.	173

Figura 4.84. Concentração de sal de fosfato na fase de topo e fundo para o processo contínuo de SDFA na extração de AC do caldo pré-tratado: a) Fase de topo; b) Fase de fundo. 174

LISTA DE TABELAS

	Páginas
Tabela 2.1. Exemplos de alguns tipos de trocadores disponíveis comercialmente. Tabela adaptada de SPADARO (2007a).	35
Tabela 3.1. Tabela de reagentes utilizados no trabalho.	44
Tabela 3.2. Regressão linear das curvas de calibração para os PEGs.	48
Tabela 3.3. Verificação do método de SKOOG (1979) para soluções de PEG em caldos microfiltrados.	49
Tabela 3.4. Fatores e níveis de valores que foram utilizados no planejamento fatorial 2^5 .	55
Tabela 3.5. Códigos e valores das variáveis utilizados no delineamento composto central rotacional (DCCR) 2^4 .	55
Tabela 4.1. Valores das resistências hidráulicas das membranas de polisulfona (R_m), a temperatura de 25° C.	75
Tabela 4.2. Condições operacionais utilizadas e dados obtidos nos experimentos de MF de 0,2 μm , dos caldos de fermentação de AC.	77
Tabela 4.3. Condições operacionais e dados obtidos nos experimentos de UF de 50 kDa, de caldos de fermentação de AC pré-tratado com a membrana de MF de 0,2 μm .	81
Tabela 4.4. Condições operacionais e dados obtidos nos experimentos de UF de 3 kDa, de caldos de fermentação de AC pré-tratado com a membrana de MF de 0,2 μm .	84
Tabela 4.5. Resultados experimentais obtidos da extração do AC por SDFA, a temperatura de $22 \pm 2^\circ \text{C}$.	88
Tabela 4.6. Análise de PEGs e AC na re-extração do AC por ultrafiltração para diferentes PEGs, na temperatura de 11° C.	89
Tabela 4.7. Análise de fósforo da re-extração do AC por ultrafiltração para diferentes PEGs, a temperatura de 11° C.	89
Tabela 4.8. Resultados experimentais obtidos da extração do AC por SDFA para ensaios na presença de etanol, a temperatura de $22 \pm 2^\circ \text{C}$.	91
Tabela 4.9. Resultados da re-extração do AC por ultrafiltração na presença do etanol para diferentes PEGs, a temperatura de 11° C.	92

Tabela 4.10. Análise de fósforo na re-extração do AC por ultrafiltração na presença do etanol para diferentes PEGs, a temperatura de 11° C.	92
Tabela 4.11. Resultados da evolução da cromatografia utilizando caldo pré-tratado com membranas de MF e UF em coluna de leito fixo preenchida com resina Streamline Q XL, a temperatura de 20° C.	100
Tabela 4.12. Valores dos parâmetros dos modelos de isoterma utilizados para o equilíbrio de adsorção de AC sobre a resina Streamline QXL, a temperatura de 20° C.	107
Tabela 4.13. Resultados experimentais obtidos da extração do AC por SDFA para re-extração do AC pela resina Amberlite IRA-400Cl, a temperatura $22 \pm 2^\circ$ C.	108
Tabela 4.14. Resultados experimentais obtidos da extração do AC por SDFA, a temperatura de $22 \pm 2^\circ$ C e pH 6,2, e para re-extração do AC pela resina Amberlite IRA-400Cl em coluna de leito fixo para avaliar influência da temperatura.	115
Tabela 4.15. Resultados experimentais obtidos da extração do AC por SDFA, a temperatura de $22 \pm 2^\circ$ C e pH 6,2, e para re-extração do AC pela resina Amberlite IRA-400Cl em tanque agitado para avaliar influência da temperatura.	118
Tabela 4.16. Parâmetros da isoterma de Langmuir e de Freundlich determinados por regressão não-linear para fase de topo do SDFA composto por PEG 600 e sal de fosfato, na resina Amberlite IRA-400Cl.	123
Tabela 4.17. Resultados experimentais obtidos da extração do AC por SDFA e da adição do etanol, a $22 \pm 2^\circ$ C e pH 6,2, e para re-extração do AC pela resina Amberlite IRA-400Cl em coluna de leito fixo.	124
Tabela 4.18. Resultados experimentais obtidos da extração do AC por SDFA e da adição do etanol, a $22 \pm 2^\circ$ C e pH 6,2, e para re-extração do AC pela resina Amberlite IRA-400Cl em tanque agitado.	127
Tabela 4.19. Parâmetros da isoterma de Langmuir e de Freundlich determinados por regressão não-linear para adsorção do AC presente na fase de topo do SDFA após a precipitação do sal fosfato por etanol, na resina Amberlite IRA-400Cl.	131
Tabela 4.20. Resultados experimentais obtidos da extração do AC por SDFA e da adição do etanol, a $22 \pm 2^\circ$ C e pH 6,2, e para re-extração do AC pela resina Streamline Q XL em coluna de leito fixo.	132

Tabela 4.21. Resultados experimentais obtidos da extração do AC por SDFa e da adição do etanol, a $22 \pm 2^\circ \text{C}$ e pH 6,2, para re-extração do AC pela resina Streamline Q XL em tanque agitado.	135
Tabela 4.22. Parâmetros da isoterma de Langmuir e de Freundlich determinados por regressão não-linear para de adsorção do AC presente na fase de topo do SDFa após a precipitação do sal fosfato por etanol, na resina Streamline Q XL.	139
Tabela 4.23 Resultado da eficiência de utilização do leito, eficiência na recuperação do produto e produtividade em coluna de leito fixo, na re-extração do AC da fase de topo do SDFa (McCABE; SMITH; HARRIOTT, 1993).	142
Tabela 4.24. Planejamento fatorial e as resposta para a análise dos efeitos na extração do AC em SDFa.	148
Tabela 4.25. Estimativa dos efeitos para K .	149
Tabela 4.26. Estimativa dos efeitos para $R(\%)$.	149
Tabela 4.27. Planejamento e respostas obtidas nos experimentos do DCCR.	151
Tabela 4.28. Análise da variância para o modelo do K e rendimento e fator de purificação.	152
Tabela 4.29. Constantes de equilíbrio da interação entre AC, coeficiente de partição, e K^0 , para diferentes PEGs.	161
Tabela 4.30. Constante de degradação do AC proveniente do produto farmacêutico Clavulin [®] no SDFa, a temperatura de 20°C .	165
Tabela 4.31. Constante de degradação do AC proveniente do meio fermentado <i>Streptomyces clavuligerus</i> em SDFa, a temperatura de 20°C .	168
Tabela 4.32. Condições operacionais e dados experimentais dos SDFa em processo contínuo e batelada.	174

NOMENCLATURA

AC	Ácido clavulânico
BSA	<i>Albumin bovine serum</i>
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
Exp	Experimento
DCCR	Delineamento composto central rotacional
MWCO	<i>Molecular weight cut off</i>
MF	Microfiltração filtração
mPEG	Massa molecular de PEG
NF	Nanofiltração
OR	Osmose reversa
PEG	Polietileno glicol
PEGs	Polietileno glicóis
Pen G	Benzilpenicilina (Penicilina G)
PRDC	<i>Perforated rotating disc contactor</i>
PSM	Processos de separação com membranas
PVDF	Polivinilidene fluorido
rTLL	Razão entre volume de fase
SDFA	Sistema de duas fases aquosas
SDFAs	Sistemas de duas fases aquosas
Temp	Temperatura
TLL	Linha de amarração (<i>Tie-line length</i>)
UF	Ultrafiltração

LISTA DE SÍMBOLO

abrev.	nome	unidade
A_{535}	Absorbância a 535	nm
A	Área da membrana	m^2
C_{PEG}	Concentração de PEG	μM
$C_{AC, topo}$	Concentração de AC na fase de topo	$mg.L^{-1}$
$C_{AC, fundo}$	Concentração de AC na fase de fundo	$mg.L^{-1}$
C_{AC}	Concentração de AC	$mg.L^{-1}$
C_{C0}	Concentração de contaminantes inicial	$mg.L^{-1}$
$C_{C0, topo}$	Concentração de contaminantes na fase de topo	$mg.L^{-1}$
$C_{AC, amostra}$	Concentração de AC na amostra	$mg.L^{-1}$
$C_{PEG, topo}$	Concentração de PEG no topo	$g.L^{-1}$
$C_{PEG, ret}$	Concentração de PEG no retido	$g.L^{-1}$
$C_{PEG, perm}$	Concentração de PEG no permeado.	$g.L^{-1}$
$C_{AC, ret}$	Concentração do AC no retido	$mg.L^{-1}$
$C_{AC, perm}$	Concentração do AC no permeado	$mg.L^{-1}$
$C_{Fos, perm}$	Concentração de fósforo no permeado	$g.L^{-1}$
$C_{Fos, ret}$	Concentração de fósforo no retido	$g.L^{-1}$
$C_{Fos, topo}$	Concentração do fósforo no topo	$g.L^{-1}$
$C_{PEG, etanol}$	Concentração de PEG na presença de etanol	$g.L^{-1}$
$C_{AC, etanol}$	Concentração de AC na presença de etanol	$mg.L^{-1}$
$C_{Fos, etanol}$	Concentração de fósforo na presença de etanol	$g.L^{-1}$
C_{xi}	Concentração de células inicial	$g.L^{-1}$
C_{xf}	Concentração de células final	$g.L^{-1}$
D	Diâmetro	m
D_{AC}	Degradação do AC	%
F	Fluxo	$kg.h^{-1}$
FP	Fator de purificação	---
H_t	Altura do leito total	cm
H_b	Altura do leito utilizado	cm
H_{unb}	Altura do leito não utilizado	cm
I	Resistividade da camada de gel	m^{-2}
I_{ps}	Resistividade da camada de gel no estado de pseudo-estacionário	m^{-2}

J_{ps}	Fluxo de permeado no estado de pseudo-estacionário	$L.h^{-1}.m^{-2}$
J_p	Fluxo de permeado	$L.h^{-1}.m^{-2}$
K_c	Índice de consistência	$Pa.s^n$
K	Coefficiente de partição	---
K^0	Coefficiente de partição hipotético	---
k_2	Constante de degradação	h^{-1}
K_D	Constante de equilíbrio modelo Langmuir	$mg.L^{-1}$
K_F	Constante da isoterma de Freundlich	$mg^{1-(1/n)} L^{1/n} g^{-1}$
K_E	Constante da isoterma de Elovich	$L.mg^{-1}$
P	Produtividade do leito	---
P_{TM}	Pressão transmembrana	Pa
P_p	Pressão do permeado	Pa
Q	Vazão de alimentação	$L.h^{-1}$
R_{PEG}	Rejeição do PEG	---
q_m	Capacidade máxima de adsorção	$mg_{AC}.g_{res}^{-1}$
R_{AC}	Rejeição do AC	---
R_{Fos}	Rejeição do fósforo	---
R_T	Resistência total	m^{-1}
R_m	Resistências hidráulicas intrínseca da membrana	m^{-1}
R	Rendimento	%
V_p	Volume de permeado	mL
V_{topo}	Volume da fase de topo	mL
$V_{amostra}$	Volume da amostra inicial	mL
V	Volume do frasco	m^3
V_Z	Vazão	$mL.min^{-1}$
T	Temperatura	$^{\circ}C$
t_{op}	Tempo de operação	h
Letras gregas		
μ_p	Viscosidade do permeado	Pa.s
Φ_1	Eficiência do leito	---
Φ_2	Eficiência de recuperação de produto	---
ρ	Densidade	$g.L^{-1}$
α	Resistência específica da camada de gel	$m.kg^{-1}$

RESUMO

O ácido clavulânico é uma substância β -lactâmica com fraca atividade antibiótica, porém é um importante fármaco agindo como um potente inibidor de enzimas β -lactamase. Estas enzimas que catalisam a hidrólise do anel β -lactâmico dos antibióticos, deixando-os sem ação antibiótica. O ácido clavulânico é produzido industrialmente por culturas submersas da bactéria filamentosa *Streptomyces clavuligerus*. Os trabalhos referentes à extração e purificação têm mostrado uma direção bastante clara e definida no sentido das etapas envolvidas que precedem à precipitação e cristalização. Na linha de extração têm sido estudados os processos com membranas de ultrafiltração, processos de extração com solventes orgânicos e extração em sistemas de duas fases aquosas (SDFAs), enquanto que a purificação tem sido estudada por processos envolvendo a troca iônica. No entanto, são poucos os trabalhos relacionados com a extração do ácido clavulânico por sistema de duas fases aquosas, não sendo estes ainda conclusivos. No presente trabalho *foi proposto utilizar o SDA para purificar o ácido clavulânico e re-extrai-lo através da adsorção por troca iônica*, fornecendo subsídios para futuros estudos de processos conjugados operando de forma contínua. A primeira técnica estudada para re-extração do ácido clavulânico do SDA foi o processo de separação com as membranas de polisulfona de microfiltração e ultrafiltração operando em escoamento tangencial, cujos resultados mostraram baixa separação entre PEG e ácido clavulânico. Numa segunda etapa utilizou-se técnica de cromatografia de troca iônica com as resinas Amberlite IRA-400Cl e Streamline Q XL. Para cromatografia de troca iônica ficou evidenciado que a resina Amberlite IRA-400Cl possibilita o processo de re-extração do ácido clavulânico da fase de topo e que o fosfato presente na fase de topo dificulta a adsorção do ácido clavulânico para ambas as resinas estudadas. Adição de etanol para precipitação dos sais de fosfato possibilitou a re-extração do ácido clavulânico da fase de topo do SDA pela resina Streamline Q XL. Como terceira etapa do processo global foi realizada a otimização da extração do ácido clavulânico através dos sistemas de duas fases aquosas, os resultados mostraram que é possível obter rendimento próximo a 100% e um fator de purificação de 1,5 vezes para o ácido clavulânico. Outro fator analisado foi a velocidade de degradação do ácido clavulânico no sistema de duas fases aquosas; esta se mostrou bastante alta na fase de fundo rica em sais de fosfato. Os ensaios do processo do sistema de duas fases aquosas contínuo foram realizados, sendo que esse processo mostrou-se operacionalmente viável. O conjunto de

resultados obtidos neste trabalho permitirão o estudo e implementação de um processo contínuo para a purificação do ácido clavulânico utilizando o sistema de duas fases aquosas.

Palavras-chave: Ácido clavulânico. Purificação. Filtração. Sistema de duas fases aquosas. Troca iônica.

ABSTRACT

Clavulanic acid is a β -lactam substance with low antibiotic activity. Nonetheless, it is an important medicine which acts as a potent β -lactamase inhibitor. These enzymes catalyze the hydrolysis of β -lactam ring of antibiotics, leaving them without antibiotic action. It is industrially produced with submerged cultures of *Streptomyces clavuligerus*, a filamentous bacterium. Extraction and purification studies have shown a very clear and defined course, when it comes to the stages that precede precipitation and crystallization. The extraction processes with ultrafiltration membranes, with organic solvents and extraction in aqueous two-phase systems (ATPS) have been studied whereas purification has been studied for processes which involve ion exchange. However, there are few works related to clavulanic acid aqueous two-phase system extraction and they are not conclusive. The present study proposed utilizing the aqueous two-phase system (ATPS) to purify the clavulanic acid and re-extract it with ion exchange adsorption, which might provide information for further studies on coupled processes which operate continuously. The first technique evaluated to re-extract the clavulanic acid was the separation process with membranes, and its results showed a low separation between PEG and clavulanic acid. In a second step, the ion exchange chromatography technique with Amberlite IRA-400Cl and Streamline Q XL resins was used. It was evidenced by the ion exchange chromatography that the Amberlite IRA-400Cl resin makes the process of re-extraction of clavulanic acid from the top phase possible and that the phosphate present in the top phase makes clavulanic acid adsorption difficult for both studied resins. Addition of ethanol, in order to precipitate the phosphate salts, made the re-extraction of clavulanic acid from the ATPS top phase by Streamline Q XL resin possible. The third step of the global process was the optimization of clavulanic acid extraction using the aqueous two-phase systems. The results showed that it is possible to obtain yields around 100% and a purification factor of 1.5 times for the clavulanic acid. Another characteristic analyzed was the clavulanic acid degradation velocity in the aqueous two-phase system; it was very high at the bottom phase which was rich in phosphate salts. Trials of continuous aqueous two-phase system process were performed. This process was shown to be operationally viable. The set of results acquired in this study will allow the study and implementation

of a continuous process for the purification of clavulanic acid utilizing the aqueous two-phase system.

Key-words: Clavulanic acid. Purification. Filtration. Aqueous two-phase system. Ion exchange.

1. INTRODUÇÃO

A descoberta dos antibióticos β -lactâmicos no início do século vinte representou um momento decisivo na luta contra bactérias patogênicas. Dados de 2003 mostram que o mercado de antibióticos β -lactâmicos representa aproximadamente 65% do mercado mundial para antibióticos; dentre os mesmos 66% são devidos a cefalosporinas e cefamicinas (ELANDER, 2003).

Desde a introdução destes antibióticos, muitos outros derivados β -lactâmicos com atividade antibiótica superior foram colocados no mercado, porém a eficiência destes fármacos foi ameaçada pelo crescente número de bactérias patogênicas resistentes aos antibióticos β -lactâmicos. Estes microrganismos são capazes de produzir enzimas β -lactamases, enzimas estas que catalisam a hidrólise do anel β -lactâmico do antibiótico, originando um produto inativo, isto é, sem ação antibiótica. Uma alternativa contra a ação da β -lactamases é o uso de inibidores de lactamases. Então em 1967 se iniciou um programa de pesquisa no *Beecham Research Laboratories*, Inglaterra, no qual foram examinados microrganismos produtores de inibidores de enzimas lactamase. Este estudo resultou na descoberta de um inibidor, o ácido olivânico, produzido por *Streptomyces olivaceus*. Um trabalho adicional conduziu à descoberta do ácido clavulânico (AC), produzido por *Streptomyces clavuligerus* e em 1980 uma combinação de amoxicilina e ácido clavulânico foi introduzida no mercado, fármaco denominado *co-amoxiclav* (ROLINSON; GEDDES, 2007). Apesar das bactérias patogênicas serem adaptáveis, mesmo após 25 anos do início do uso clínico, a *co-amoxiclav* continua apresentando excelente atividade contra a maioria das espécies de bactérias patogênicas, e são relativamente raros os casos de resistências (BUYNAK, 2006).

Os produtos das combinações comerciais de AC junto com a amoxicilina ou ticarcilina fazem com que o mercado de produção de AC movimente vários milhões de dólares no mercado farmacêutico. Assim, a produção de AC tem despertado um grande interesse das indústrias farmacêuticas do mundo, com isso criou-se um incentivo poderoso para entender a bioquímica e a genética da produção, e o aperfeiçoamento dos métodos de separação e purificação do AC (SAUDAGAR; SURVASE; SINGHAL, 2008).

A recuperação do AC após a fermentação é importante para propósitos analíticos e comerciais. A recuperação pode envolver vários métodos de extração e purificação, sendo que a estratégia e a combinação destes métodos têm um papel fundamental na redução do custo do processo global. De um modo geral o processo convencional de extração e purificação do AC do caldo fermentado inclui usualmente as seguintes etapas: a) tratamento do caldo fermentado por adição de flocculante; b) separação líquido/sólido por filtros rotativos a vácuo; c) adição de surfactante e extração do antibiótico com solvente; d) processo de purificação, re-extração da solução aquosa, concentração e cristalização do antibiótico (NABAIS; CARDOSO, 1995). No entanto, o AC não possui nenhum grupo hidrofóbico forte presente, que conduz a uma elevada taxa de degradação por hidrólise durante o processo de purificação, particularmente as etapas de purificação que operam a valores extremos de pH (BERSANETTI *et al.*, 2005). Com isso, torna-se essencial o estudo de processos de purificação que diminuam a sua hidrólise.

No referente ao desenvolvimento do processo de purificação de antibiótico, cada vez mais tem sido abordado a utilização de membrana de microfiltração (MF) e ultrafiltração (UF) na etapa primária de purificação. O uso desta tecnologia tem se demonstrado viável, uma vez que, esta proporciona altos rendimentos e filtrados livres células e proteínas que dificultam a extração por solventes (NABAIS; CARDOSO, 1999; HANFT, 2007).

A cromatografia de troca iônica é usada para o isolamento e purificação do AC após o pré-tratamento do caldo por filtração ou extração líquido-líquido. Na literatura, trabalhos têm abordado o uso da cromatografia de troca iônica na purificação do AC, no entanto, inerente aos bons resultados obtidos em relação à capacidade de concentrar e purificar o AC é observado um baixo rendimento (MAYER; ANSPANCH; DECKWER, 1996; BARBOZA; ALMEIDA; HOKKA, 2002a). Neste aspecto, faz se necessária avaliação de adsorvente que proporcione uma alta recuperação do AC, consolidando assim o uso da cromatografia de troca iônica como uma das etapas de purificação do AC.

Durante a última década muita atenção tem sido dada é técnica de purificação à extração de biomoléculas (como proteínas, antibióticos e enzimas) utilizando o sistema de duas fases aquosas (SDFA). Geralmente este processo apresenta uma alta taxa de extração e uma relativa seletividade em relação a que pode ser obtido na extração de

solventes orgânicos como n-butanol, acetato de etila, acetato de amila, acetato isopropílico, éter e clorofórmio (ZIJLSTRA; GOOIJERT; TRAMPERT, 1998). Os sistemas de duas fases aquosas (SDFAs) resultam da incompatibilidade de dois polímeros em soluções, ou entre um polímero e um sal. O sistema composto polietileno glicol (PEG) e sal têm sido usados para estudo de extração de antibióticos por apresentarem baixo custo e uma elevada seletividade para os antibióticos (BORA *et al.* 2005). Outra vantagem dos SDFAs é a reciclagem dos seus componentes. No que se refere ao estudo da extração e purificação do AC utilizando o processo SDFa podemos destacar o trabalho de VIDEIRA; AIRES BARROS (1994), porém o trabalho aborda apenas aspectos gerais da utilização do SDFa para extração. Além disso, não há nenhum trabalho que aborde a re-extração do AC da fase rica em PEG. Assim, os estudos destas etapas de extração e re-extração são determinantes para implementação do SDFa como uma etapa do processo de purificação do AC.

Tendo em vista a importância dos antibióticos β -lactâmicos tanto no aspecto clínico quanto econômico, foi realizada uma interação entre os grupos pesquisa: o grupo de Engenharia Bioquímica do DEQ/UFSCar, pesquisadores do IQ/UNESP Araraquara e de Bioprocessos da FEA/Unicamp no desenvolvimento de um projeto de pesquisa com a temática em “Produção e purificação do ácido clavulânico, cefamicina C e outros metabólitos bioativos de *Streptomyces* (Projeto Temático Proc. N°. 2005/55079-4)”. Este projeto busca o desenvolvimento de tecnologias, para fins industriais, de produção e purificação do ácido clavulânico e cefamicina C, e isolar, identificar e caracterizar novos compostos de *Actinomicetos* do gênero *Streptomyces*. Nesse grande projeto foram desenvolvidas pesquisas sobre as etapas de produção de produtos bioativos obtidos de *Streptomyces*, sendo que para o AC, parte do objetivo é buscar alternativas em relação ao desenvolvimento de sistemas de separação, extração e purificação, que foi desenvolvido nesta tese de doutorado.

1.1. Objetivo geral

Neste contexto, o presente trabalho teve como hipótese a utilização do SDFA para purificar o AC e re-extraí-lo através da adsorção por troca iônica, contribuindo para desenvolvimento de processos conjugados.

1.1.1. Objetivos específicos

Para atingir a plena realização do objetivo geral, os seguintes objetivos específicos foram propostos:

1. Estudos dos aspectos gerais da microfiltração e ultrafiltração com filtro operando em escoamento tangencial, utilizados como a etapa de separação primária;
2. Otimização do SDFA para extração de AC, proveniente de caldo pré-tratado por membrana de ultrafiltração, utilizando planejamento fatorial, buscando-se como resposta os melhores valores para o coeficiente de partição, rendimento, fator de purificação e fator de concentração;
3. Estudos experimentais e estabelecimento de um processo para re-extrair o AC da fase PEG;
4. Avaliação do processo contínuo de extração/purificação de AC utilizando o SDFA.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Ácido clavulânico

O ácido clavulânico (AC) é uma substância de ocorrência natural detectada pela primeira vez em cultura de *Streptomyces clavuligerus*, em 1976 por pesquisadores do *Beecham Laboratories* na Inglaterra. É uma substância β -lactâmica resultante de uma fusão de dois anéis: o anel β -lactâmico e o anel oxalidino, conforme ilustra a Figura 2.1. Diferentemente das penicilinas e cefalosporinas, possui um átomo de oxigênio no lugar de um átomo de enxofre.

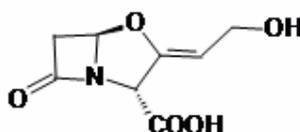


Figura 2.1. Estrutura molecular do ácido clavulânico (AC) (BUTTERWORTH, 1984).

O AC é um potente inibidor da enzima β -lactamase, porém possui uma fraca atividade antibacteriana. Surgiu de uma cultura microbiana que fazia parte do programa de separação de inibidores de β -lactamase. Este estudo foi proposto devido à possibilidade de usar um inibidor de β -lactamase em conjunto penicilinas ou cefalosporinas para conter problemas de resistência aos antibióticos β -lactâmicos, desde que patógenos importantes desenvolveram resistência a estes produzindo a β -lactamase, uma enzima, que destrói o anel β -lactâmico do antibiótico (BUTTERWORTH, 1984).

Também são conhecidos outros dois compostos comerciais inibidores de β -lactamases, o sulbactamo e o tazobactamo, porém de origem sintética (Figura 2.2). Entretanto, segundo PAYNE *et al.* (1994) o AC apresenta atividade inibidora de enzimas β -lactamase quase 5 vezes maior que o tazobactamo e quase 600 vezes maior que o sulbactamo.

Apesar do fim da patente em 2002 da *GlaxoSmithKline* (GSK) sobre AC (SAUDAGAR; SURVASE; SINGHAL, 2008), atualmente, o Brasil ainda importa na sua totalidade o AC, sendo comercializado pela *SmithKline Beecham* do Brasil Ltda. com o nome de *Clavulin* e seu uso terapêutico se faz em conjunção amoxicilina (penicilina semi-sintética).

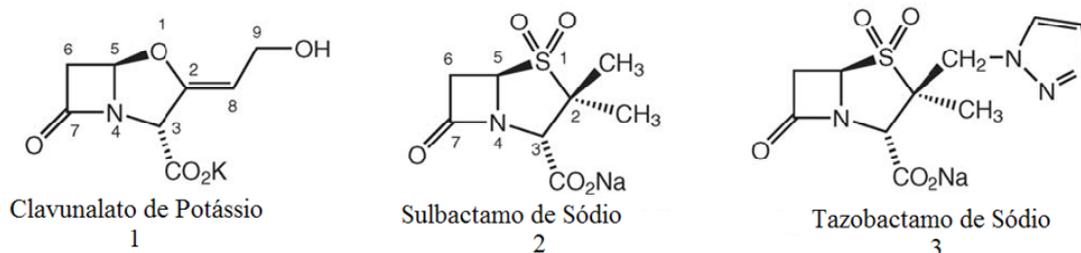


Figura 2.2. Compostos comerciais de inibidores de β -lactamases (BUYNAK, 2006).

2.1.1. Estabilidade do AC

O AC na sua forma natural é quimicamente instável, devido ao grupo carbonila ligado ao anel beta-lactâmico ser susceptível a hidrólise (Figura 2.3). Esta hidrólise pode ser catalisada por ácido (H^+) ou base (OH^-), a molécula de água pode funcionar como ácido, doando prótons, quanto como base, recebendo prótons.

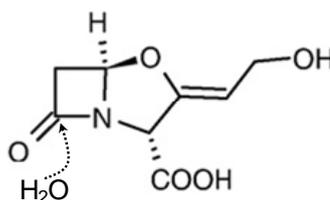


Figura 2.3. Ponto passivo de hidrólise na molécula de ácido clavulânico (AC).

A decomposição do AC devido ao ataque da água e de íons hidroxila ao grupo carbonila do anel beta-lactâmico segue uma cinética de pseudo-primeira ordem obedecendo à equação abaixo (BERSANETTI *et al.*, 2005):

$$-\frac{dC_{AC}}{dt} = k_2 C_{AC} \quad (2.1)$$

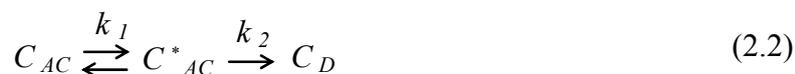
onde k_2 é a constante de degradação do AC e C_{AC} é a concentração de AC.

HAGINAKA *et al.* (1981) concluíram, em seu estudo de degradação utilizando temperaturas de 35° C, 60° e 100° C, que a máxima estabilidade para o AC ocorre a 35°

C, com uma força iônica igual a 0,5 M. Além disso, os autores concluíram que a constante de velocidade de degradação aumenta com o aumento da concentração do tampão.

BERSANETTI *et al.* (2005) concluíram que a estabilidade do antibiótico a 20° C e força iônica 0,5 M é maior em pH 6,0 e que a degradação ocorre mais rapidamente em soluções básicas do que em soluções ácidas. A constante da taxa de degradação é altamente dependente no pH, o gráfico logarítmico de k_2 versus pH é parabólico com um mínimo a pH 6,2 e uma inclinação acentuada para condições ácidas ou básicas. Verificou-se também que as constantes de degradação do AC em soluções aquosas são menores em relação às obtidas do meio de fermentação, devido à presença de outros componentes do meio, tais como compostos que contém amônio.

No entanto, SANTOS *et al.* (2009) propôs um novo modelo que leva em consideração o equilíbrio entre forma ativa e reversível do AC, após o longo tempo de degradação, como descrito pela seqüência de reação:



onde k_1 é a constante do equilíbrio da complexação-descomplexação, k_2 é a constante de pseudo-primeira ordem da reação irreversível de degradação e C_D é a concentração do produto de degradação e C^*_{AC} é concentração no equilíbrio.

No entanto, apesar dessa nova hipótese os autores concluíram que a constante de degradação aumenta com temperatura, descrevendo um comportamento típico de Arrhenius, e cuja energia de ativação obtida ($E_a = 22,0$ kJ/mol) é próximo a obtida na literatura em pH 6,2 para o AC em caldos de fermentação pré-tratados ($E_a = 24,0$ kJ/mol), mas menor do que obtidos com AC comercial ($E_a = 46,1$ kJ/mol) (BERSANETTI *et al.*, 2005). Outros valores mais elevados de energia de ativação relatados anteriormente na literatura ($E_a = 61,5-79,5$ kJ/mol) deve ser associado à degradação muito mais rápida obtida sob diferentes condições de pH por causa de uma temperatura mais elevada intervalo (35-65° C). Os autores ainda investigaram a estabilidade do AC em temperatura 30° C na presença de NaCl, Na₂SO₄, CaCl₂ e MgSO₄ nas concentrações de 0,1 e 0,5 M e tampão McIlvaine (pH 6,5). Todos os sais levaram à instabilidade AC e um aumento da velocidade de degradação em relação ao tampão, e esse efeito diminuiu em seguinte seqüência: Na₂SO₄ > MgSO₄ > CaCl₂ >

NaCl. Os autores concluíram que este decréscimo está relacionado com a força iônica da solução de cada sal.

2.2. Processo de purificação

A purificação de uma determinada biomolécula envolve uma série de etapas convenientemente ordenadas, geralmente visando à obtenção do máximo de rendimento e pureza, além de custos compatíveis com os de mercado. De um modo geral a purificação de biomoléculas pode ser dividida em quatro principais etapas (ZUÑIGA *et al.*, 2003):

a) Clarificação ou remoção de compostos insolúveis - nesta etapa ocorre a separação de células e fragmentos do meio de cultivo. Normalmente nesta etapa é usada técnica de separação como centrifugação, precipitação, microfiltração e ultrafiltração.

b) Isolamento do produto ou concentração - denominada como purificação primária ou de “captura”. Considerada uma etapa de purificação de baixa resolução, compostos não desejados com propriedade divergente do composto desejado são retirados, com aumento significativo da concentração do composto de interesse. As técnicas de separação, comumente, utilizadas são cromatografias de troca-iônica, cromatografia com ligante específico (afinidade), cromatografia por interação hidrofóbica, sistema de duas fases aquosas, ultrafiltração e nanofiltração.

c) Purificação de alta resolução - nesta etapa o composto de interesse é concentrado e as impurezas com propriedades similares são na sua maioria retiradas. São utilizadas para esta etapa técnicas de cromatografia (afinidade, troca iônica e exclusão molecular).

d) Condicionamento do produto ou polimento - etapa final da purificação. São utilizadas técnicas como cristalização, liofilização e secagem.

No entanto, a dificuldade e a complexidade dos processos bioseparação depende do nível do grau de pureza. Os produtos destinados a usos terapêuticos requerem uma maior pureza e, portanto, a complexidade do processo é elevada. Uma medida dessa complexidade é o custo do processo de purificação em relação ao custo final do produto, o qual pode chegar a 80%. Visto isso, há a necessidade de se obter técnicas de bioseparação em larga escala que seja eficiente, econômicas e que atinjam altos graus de recuperação e pureza, mantendo a atividade biológica da molécula

(KILIKIAN; PESSOA JR, 2001). Com isso, sob o ponto de vista econômico, o desenvolvimento, e o aperfeiçoamento de processos de recuperação e purificação de biomoléculas passaram a ser de vital importância para a produção industrial (SEADER; HENLEY, 1998).

2.3. Separação primária por membranas

Os processos de separação com membranas (PSM) vêm cada vez mais se tornando uma importante alternativa aos processos convencionais como a centrifugação e o filtro-rotativo, devido à flexibilidade operacional, o fato dos sistemas com membranas serem mais compactos, facilidade no aumento de escala, elevada estabilidade, o processo pode ser operado em temperaturas moderadas e ambientes, o estresse químico e físico pode ser minimizado, a concentração e a purificação podem ser obtidas em uma única etapa e a obtenção de produtos finais de melhor qualidade. Além disso, a separação por membrana pode ser realizada de forma contínua o que aumenta a produtividade.

Os mecanismos envolvidos na permeação baseiam-se em forças dirigidas: diferença de pressão e diferença de concentração. Tendo como base estes mecanismos os PSM podem ser divididos em:

- a) microfiltração (MF): separação de partículas com granulometria entre 0,02 a 10 μm ;
- b) ultrafiltração (UF): separação de partículas e separações poliméricas com tamanho de 0,001 a 0,02 μm ;
- c) nanofiltração (NF): separação de moléculas com tamanho entre 500 a 2000 Da.
- d) hiperfiltração (HF): também conhecida como osmose reversa (OR), onde se separa solutos iônicos e permeia o solvente.

A Figura 2.4 apresenta a faixa de atuação dos diferentes processos com membranas, bem como de alguns processos clássico, de separação, em função do tamanho ou das características físico-químicas das espécies a serem separadas. Na prática, atualmente os processos combinados, envolvendo processos clássicos e PSM,

cada qual atuando na faixa em que é mais eficiente, tem se mostrado mais vantajoso do que a utilização de cada uma das tecnologias isoladamente.

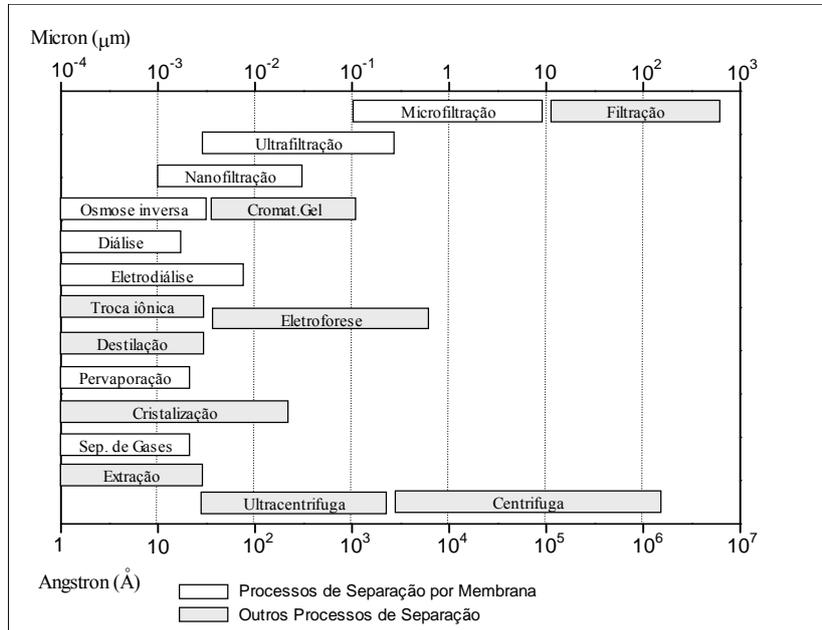


Figura 2.4. Quadro comparativo entre processos clássicos de separação e os PSM, função das dimensões das espécies a serem separadas. Figura adaptada de HABERT; BORGES; NOBREGA (2006).

Conforme definido anteriormente os poros das membranas de PSM podem variar entre 1×10^{-3} a 1×10^2 μm , para uma determinada membrana não há diâmetro único, mas uma distribuição normal em torno de um diâmetro médio, portanto, a membrana pode reter de maneira distinta, os solutos de pesos moleculares diferentes. Para processos cuja força motriz é o gradiente de pressão a capacidade seletiva da membrana, em relação a uma dada espécie, é medida através do coeficiente de rejeição (R) que é definido pela relação:

$$R = 1 - \frac{C_P}{C_0} \quad (2.3)$$

onde C_P e C_0 representam a concentração do soluto no permeado e na alimentação, respectivamente. Por este motivo às membranas são caracterizadas através da chamada peso molecular de corte (*molecular weight cut offs* - MWCO), que relaciona o coeficiente de rejeição em função do peso molecular do soluto (RAGESH *et al.*, 2003).

2.3.1. Microfiltração (MF) e ultrafiltração (UF) de fluxo tangencial

Processos com membranas, para os quais a diferença de pressão é força motriz, podem se destacar a microfiltração e ultrafiltração de fluxo tangencial (“*cross flow filtration*”) que vem emergindo gradativamente como processo de bioseparação para a purificação e polimento de biomoléculas como drogas terapêuticas, enzimas, hormônios, anticorpos.

A filtração tangencial é realizada pela passagem de suspensão em escoamento paralelo/tangencial a uma membrana semipermeável, conforme mostra a Figura 2.5.

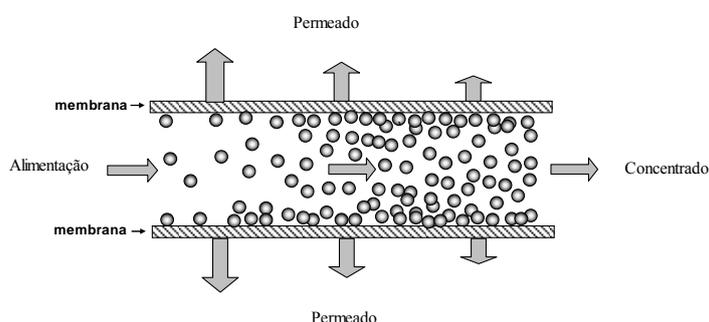


Figura 2.5. Esquema de uma membrana de filtração tangencial. Figura adaptada da MILLIPORE CORPORATION (2003).

A microfiltração e a ultrafiltração de fluxo tangencial são amplamente aplicadas como um primeiro estágio de recuperação. A MF é mais utilizada para remover partículas suspensas incluindo células e organelas presentes em um caldo fermentado. Embora sejam baseadas em diferentes mecanismos, pode-se dizer que a operação unitária de centrifugação tem a mesma função da microfiltração (NABAIS; CARDOSO, 1995). A UF é uma técnica utilizada para separar moléculas de diferentes tamanhos bem como promover o aumento da concentração do soluto de interesse em solução.

Desta forma, a microfiltração e ultrafiltração têm muitas aplicações em bioprocessos os quais poderiam ser destacados:

1. Separação inicial de células de um meio de cultura;
2. Separação de fragmentos celulares após um processo de ruptura de células;
3. Fracionamento de proteínas presentes em um meio, baseando-se no tamanho da proteína;
4. Reciclar biomassa em uma fermentação contínua.

Dos itens 3 e 4 verifica-se que as membranas podem ser aplicadas em fermentações e processos enzimáticos contínuos. BATISTA-NETO *et al.* (2005) realizou um estudo da produção contínua de AC em que o reciclo celular foi realizado utilizando um sistema de microfiltração de fluxo tangencial utilizando uma membrana de polisulfona.

2.3.2. Geometria dos módulos de filtração de fluxo tangencial

Membranas são fabricadas ou preparadas em vários formatos. Segundo HABERT; BORGES; NOBREGA (2006) as principais características a serem consideradas no projeto de um módulo de membrana são:

- O controle das condições de escoamento da mistura a ser processada que permita minimizar os efeitos da polarização de concentração no fluxo permeado e na rejeição.
- A facilidade de limpeza do módulo, em particular quanto a necessidade de condições assépticas de processamento, como na indústria de alimentos e em biotecnologia;
- O uso, quando possível, de matérias primas de baixo custo;
- A maior relação possível entre área de membrana e volume do módulo.

Os formatos mais comuns usados para escoamento tangencial são:

a) Tipo cilíndrico – os módulos cilíndricos são subdivididos em: membrana tubular com diâmetro externo acima de 3 mm, membrana capilar (diâmetro externo entre 0,5 e 3 mm e fibra oca com diâmetro inferior a 0,5 mm. A principal vantagem desta geometria é o fato das fibras ocas e capilares dispensarem suporte, o que reduz significativamente o custo de produção do módulo. No entanto, para a membrana tubular exige-se um suporte para fornecer resistência mecânica aumentando o custo do modelo.

b) Tipo espiral – no módulo espiral, as membranas são alternadas entre dois espaçadores, sendo que um desses serve como canal coletor para o permeado, enquanto que outro fornece espaço para escoar a solução de alimentação. As membranas conjuntamente com os espaçadores são enroladas em torno de um duto perfurado, para o qual o permeado escoar. Uma desvantagem do módulo espiral é que o aumento de escala

não é linear. Porém, módulos espirais são uma opção de baixo custo para operações de unidade de área muito grandes.

c) Tipo placa - em um módulo de membrana placa, as camadas de membrana são alternadas com camadas de uma tela como separador e são dispostos juntos em um suporte de filtração. O suporte fornece resistência mecânica à membrana, quando submetida a diferenças de pressão elevadas. Alimentação ocorre simultaneamente a todas as membranas e o filtrado é coletado através dos canais de coleta. Módulos de placa geralmente têm densidades de embalagem altas (área de membrana por área de espaço de chão). Módulos com esta concepção têm custo de fabricação elevado. Entretanto, as condições de escoamento da alimentação e do permeado podem ser facilmente controladas, bem como as membranas que são danificadas durante a operação podem ser substituídas sem perda do módulo (MILLIPORE CORPORATION, 2003; HABERT; BORGES; NOBREGA, 2006).

O *design* básico para cada um destes módulos está representado na Figura 2.6.

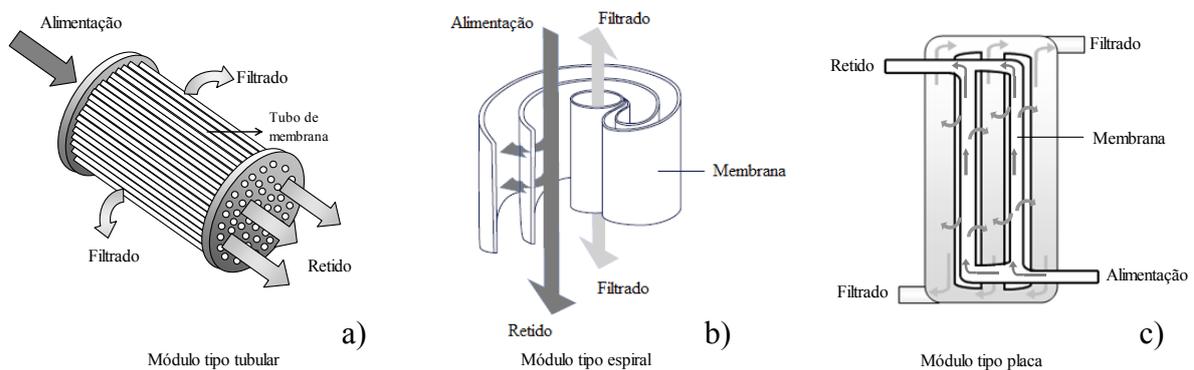


Figura 2.6. Representação esquemática de diferentes módulos de filtração tangencial: a) tubular; b) espiral; c) placa. Figura adaptada da MILLIPORE CORPORATION (2003).

Diversos trabalhos têm abordado o uso dos módulos de placa (TESSIER; BOUCHARD; RAHNI, 2005; HWANG *et al.*, 2006; ZHOU *et al.*, 2006), modulo espiral (LI *et al.*, 2004) e tubular (BRONSTEIN; MONTE ALEGRE, 1998; CARRÈRE; BLASZKOWA; BALMANN, 2001; LI; SHAHBAZI; KADZERE, 2006) para retirada de células do caldo de fermentação. No entanto, MORÃO; BRITES ALVES; CARDOSO (2001) estudaram a ultrafiltração do caldo de fermentação do antibiótico de demeclociclina (DMCT) produzido por *Streptomyces aureofaciens*,

utilizando dois sistemas de ultrafiltração de diferentes configurações geométricas: um módulo tipo tubular e outro módulo tipo placa. Os módulos eram construídos com membranas de ultrafiltração de polivinilidene fluorido (PVDF) e um polímero a base de flúor ambas as membranas com MWCO de 100 kDa. Para o sistema de placa, altos fluxos de permeados foram obtidos, no entanto, houve entupimento dos canais do módulo utilizando este caldo em particular. Ao contrário, para o módulo tubular, não ocorreu entupimento dos tubos. Os resultados obtidos pela ultrafiltração foram comparados com os obtidos pela filtração industrial que utilizam filtros rotativos a vácuo. Os mesmos rendimentos são alcançados para a mesma diluição em ambos os processos de filtração, mas a ultrafiltração tem a vantagem de não necessitar de filtro extra e floculantes, como os utilizados nos processos de filtração convencional. Além de produzir um filtrado de qualidade, completamente livre de sólidos em suspensão e facilitando os estágios adicionais de purificação.

2.3.4. Fluxo de permeado

De um modo geral, para os processos que utilizam o gradiente de pressão como força motriz, o fluxo de permeado é diretamente proporcional ao próprio gradiente de pressão, ou seja:

$$\underline{J} = B\underline{\nabla}P \quad (2.4)$$

onde, B é constante de proporcionalidade que depende, das características da membrana e da solução a ser processada e $\underline{\nabla}P$ é o gradiente de pressão através da membrana (HABERT; BORGES; NOBREGA, 2006). Para um solvente puro, considerando transporte de massa numa única direção (direção z , transversal à membrana), a pressão aplicada na membrana é caracterizada pela relação linear entre o fluxo de solvente (J) e a pressão aplicada (ΔP), como segue:

$$J = L_p \Delta P = \frac{\Delta P}{\mu \cdot R_m} \quad (2.5)$$

onde, L_p é a permeabilidade hidráulica da membrana;
 μ é a viscosidade dinâmica do solvente puro;

R_m é a resistência hidráulica da membrana.

No entanto, um problema comum na MF e UF ocorre quando a solução a ser filtrada for um meio complexo, como um caldo de fermentação, há uma diminuição do fluxo de permeado, J em relação ao obtido com o solvente puro. Esta diminuição é resultado de fenômenos de diferentes origens físicas que acontecem na interface membrana e solução. O conjunto destes fenômenos é denominado *fouling* (incrustação) da membrana e, muitos casos, podem tornar inviável uma dada aplicação. Assim, adotando-se o modelo da resistência de maneira análoga à equação 2.4, a relação entre o fluxo permeado e a diferença de pressão aplicada entre os dois lados da membrana passa ser expressa por uma equação do tipo:

$$J = \frac{\Delta P}{\mu \cdot R_T} \quad (2.6)$$

onde, ΔP é a diferença de pressão entre os dois lados da membrana (pressão transmembrana);

μ é a viscosidade da solução que permeia através da membrana;

R_T é a resistência total à transferência de massa através da membrana. Esta resistência pode ser considerada uma soma de vários componentes como definida:

$$R_T = R_m + R_a + R_b + R_g + R_p \quad (2.7)$$

onde, R_m é a resistência hidráulica da membrana, que é propriedade intrínseca da membrana;

R_a é a resistência adicional devido ao fenômeno de adsorção das moléculas de soluto na superfície da membrana e no interior de seus poros devido às interações físico-químicas com material da membrana substância;

R_b é a resistência adicional devido ao bloqueio físico de poros por moléculas ou partículas em suspensão;

R_g é a resistência adicional devido à formação de uma camada gel sobre a membrana por macromoléculas que são depositadas na superfície da membrana. Solutos de baixo peso molecular, como sais, por exemplo, podem atingir o limite de solubilidade e precipitarem na superfície da membrana;

R_p é a resistência adicional devido ao fenômeno de polarização de concentração, que é caracterizado pelo equilíbrio entre a quantidade de soluto que é transportado em

direção à membrana, e a quantidade de soluto de se difunde da região próxima à superfície da membrana em direção ao seio da solução (JIRARATANANON; CHANACHAI, 1996).

Este problema de *fouling* da membrana pode ser minimizado pela diminuição da pressão e aumento da velocidade tangencial (QUEIROZ; COLLINS; JARDIM, 2001). VELA *et al.* (2006) analisaram um modelo para prever a formação do *fouling* da membrana de ultrafiltração tangencial em várias pressões transmembrana e velocidades tangenciais. Os autores utilizaram uma membrana monotubular de cerâmica ZrO_2-TiO_2 com MWCO de 15 kDa e solução de 5 g.L^{-1} de PEG 3500. Apesar do modelo não descrever com precisão a dinâmica do *fouling* em relação aos testes experimentais. Os autores constataram que aumento da velocidade tangencial do fluxo diminui a formação do *fouling* e conseqüentemente o aumento do fluxo de permeado numa certa pressão constante.

HWANG; HWANG (2006) estudaram os efeitos operacionais no fluxo de permeado, formação da camada de gel e no coeficiente de rejeição da proteína BSA (*Albumin bovine serum* - Albumina de soro bovino) e da mistura binária células/BSA utilizando uma membrana de microfiltração de fluxo tangencial composta por éster de celulose com MWCO de $0,1 \mu\text{m}$. A camada de gel teve um papel principal no fluxo de permeado e no coeficiente de rejeição da BSA. O fluxo de permeado aumentou com o incremento da velocidade tangencial, mas mostrou um decréscimo com aumento da pressão ou pH da suspensão. Foi observado um aumento do coeficiente de rejeição da BSA com aumento da pressão em conseqüência do aumento da camada de gel. Os autores concluíram que uma alta velocidade do fluxo tangencial e baixa pressão transmembrana eram as melhores condições para purificar a proteína BSA utilizando a microfiltração de fluxo tangencial.

2.3.5. Aplicação do processo de separação por membrana (PSM) na purificação de antibióticos

Diversos trabalhos têm apresentado resultados de estudos com a utilização de membranas para separação de antibióticos. NABAIS; CARDOSO (1995) realizaram estudos da ultrafiltração utilizando os caldos fermentados de benzilpenicilina (Pen G) e AC para separação de sólido de líquido, recuperação do antibiótico e retenção de

proteína solúvel como alternativa do uso os filtros rotativo a vácuo, flocculantes e agentes anti-emulsão. Os autores utilizaram membranas de polivinilidene fluorido (PVDF) com MWCO de 100 kDa e 200 kDa. Apesar da membrana de 200 kDa apresentar uma alta recuperação dos antibióticos Pen G e AC (96%), e apresentar alto fluxo de permeado, não houve retenção das proteínas solúveis, e como consequência ocorreu à formação de emulsão na extração por solvente acetato de butila. O permeado da membrana de 100 kDa proporcionou uma extração por solvente sem a formação de emulsão para ambos os caldos de Pen G e AC. Ficou assim, demonstrado a viabilidade da utilização da membrana de 100 kDa em substituição ao processo convencional de clarificação dos caldos destes antibióticos.

BRITES ALVES; MORÃO; CARDOSO (2002) estabeleceram um procedimento para isolamento do AC de caldos fermentativo industriais utilizando a tecnologia de membranas para concentração do produto antes da extração por solvente. Trabalhando com membranas cerâmicas de tamanho de poro de 150 kDa, os autores concluíram que esta membrana proporcionou altas vazões de permeação, porém deram origem a permeados de difícil separação na operação por extração com solvente devido à presença de proteínas. Para solução desse problema utilizaram membranas com o MWCO de 20 e 15 kDa que forneceram permeados mais puros, favorecendo a extração por solvente. Ainda assim utilizaram a nanofiltração para obter permeados mais concentrados e passíveis de serem utilizados na extração com solvente ou resina.

LI *et al.* (2004) utilizaram a membrana de PVDF com MWCO de 5, 20 e 50 kDa para tratar o caldo de Pen G após a remoção das células. O permeado da UF foi submetido à extração solvente (extração ácida a pH 2,0). Os resultados experimentais mostraram que UF pode melhorar a operação de extração significativamente em relação à separação de fase que ocorre no processo de extração por solvente, eliminando a adição de qualquer agente antiemulsificante, e promovendo um aumento na recuperação da extração e qualidade do produto. Fato semelhante foi observado para os permeados de UF para os antibióticos Foram observados UF nas extrações dos antibióticos eritromicina e medmicina (extração alcalina a pH 10,0 e 8,7, respectivamente). Os autores concluíram que a UF foi capaz de remover bioemulsificantes presente no caldo de fermentação e consequentemente melhorando a operação de extração por solvente.

TESSIER; BOUCHARD; RAHNI (2005) avaliaram a capacidade do uso conjugado da ultrafiltração e nanofiltração para separação e purificação do antibiótico

Pen G. Os autores utilizaram membranas orgânicas de ultrafiltração de MWCO de 5, 30 e 100 kDa e membrana de nanofiltração de MWCO de 300 Da. Os resultados demonstraram uma alta recuperação (89,0-91,0%) da Pen G pelas membranas de UF de 30 e 100 kDa. No entanto, uma leve emulsão é formada durante a separação de fase por solvente. Em relação à membrana de UF de 5 kDa foi obtida uma recuperação mais baixa (81%) da Pen G, mas sem formação de emulsão e um rendimento de extração por solvente alto de 94%. A nanofiltração dos permeados das membranas de 30 kDa e 100 kDa tem uma alta recuperação (98%), mas são formadas emulsões estáveis, reduzindo o rendimento da extração (80,0 a 82,6%). Para a nanofiltração do permeado de 5 kDa a recuperação do antibiótico foi alta (97,4%), conduzindo um alto rendimento na extração sem formação de emulsão.

Destacam-se também os trabalhos realizados por MORÃO *et al.* (2006a), MORÃO; BRITES ALVES; AFONSO, (2006b) e MORÃO *et al.* (2006c), que investigaram a utilização de membranas de nanofiltração (NF) para a purificação do AC. Nestes trabalhos os autores utilizaram AC produzido industrialmente por fermentação. No entanto, para os processos que utilizam membranas em que o escoamento é tangencial à superfície da membrana, é verificada a ocorrência do declínio do fluxo permeado durante o processo. Isso causa um impacto econômico negativo, exigindo um estágio de diafiltração que por sua vez produz caldos mais diluídos (SILVA *et al.*, 2007).

SILVA *et al.* (2007) realizaram trabalhos a fim de analisar o comportamento do fluxo de permeado em filtrações tangenciais com membranas de MF com 0,2 μm de tamanho de corte e área de 0,36 m^2 e membranas de UF com 50 kDa e 3 kDa de tamanho de corte e área de 0,011 m^2 . Os estudos foram realizados a diferentes valores de pressão transmembrana (P_{TM}), temperatura e velocidade de escoamento. Dos resultados experimentais da MF, os autores verificaram que é conveniente trabalhar com maiores velocidades e menores P_{TM} . Com relação à UF, verificou-se que o aumento da P_{TM} não promove um aumento proporcional do fluxo. Nesses estudos os autores puderam definir as melhores condições de trabalho para a MF sendo: P_{TM} de 98 kPa a temperatura de 11° C e vazão de alimentação de 21,6 $\text{L}\cdot\text{h}^{-1}$. Para as UF, estabeleceram a temperatura de 11° C, vazão de alimentação de 21,6 $\text{L}\cdot\text{h}^{-1}$, enquanto que a P_{TM} recomendada não deve exceder a 80 kPa.

2.4. Sistema de duas fases aquosas – S DFA

Uma das técnicas de extração líquido-líquido de biomoléculas cada vez mais em estudos são os sistemas de duas fases aquosas. Esses sistemas foram descritos pela primeira vez na literatura pelo microbiólogo holandês Beijerinck em 1896, que observou ao se misturar gelatina, ágar e água, em certas concentrações ocorria formação de um sistema de duas fases, sendo a fase inferior constituída principalmente por ágar (ou amido) e a fase superior por gelatina. No entanto, somente em meados dos anos 1950, Albertsson descobriu que o polietilenoglicol (PEG), fosfato de potássio e água, assim como o PEG, dextrana e água também formavam os sistemas de duas fases aquosas. Foi Albertsson que reconheceu a possível utilização destes sistemas como método de separação aplicado a biomoléculas, partículas celulares e células intactas sob condições que preservem a sua atividade biológica, estabelecendo um grande número de diagramas de fase de vários sistemas de duas fases aquosas, descrevendo também as suas propriedades físico-químicas básicas (DIAMOND; HSU, 1992).

Desde que introduzido por Albertsson, os sistemas de duas fases aquosas polímero/polímero e polímero/sal se mostraram proveitosos para extração de materiais biológicos, como células, organelas, proteínas e ácidos nucleicos (ALBERTSSON, 1986; WALTER; WIDEN, 1994). Recentemente, a extração por sistema de duas fases aquosas está sendo utilizada para purificação de enzimas em larga escala, purificação de enzimas utilizando substâncias ligantes afins (SILVA; KULA; FRANCO, 1999).

Uma das características importantes dos sistemas de duas fases aquosas é sua elevada composição em água (cerca de 85-99%), o que permite a partição de biomoléculas e de partículas celulares em condições não desnaturantes. As propriedades físicas dos sistemas bifásicos aquosos podem ser alteradas por manipulação de sua concentração e composição dos polímeros e sais. Deste modo, a partição de moléculas e de partículas biológicas pode ser explorada para obtenção de separações, que de outro modo seriam difíceis ou mesmo impossíveis de serem realizadas (JOHANSSON; TJERNELD, 1994; GAVASANE; GAIKAR, 2003).

As principais vantagens na purificação de biomoléculas pelo sistema de duas fases aquosas são: a facilidade e confiabilidade no aumento da escala; rápida transferência de massa; equilíbrio alcançado com recursos a baixa energia na forma de mistura mecânica; possibilidade de se desenvolver um processo contínuo de extração;

separação rápida e seletiva; possibilidade de se conduzir à extração à temperatura ambiente e mais econômico que outros processos de separação convencionais como cromatografia (ALBERTSSON, 1986).

O desenvolvimento de extrações líquido/líquido utilizando SDFA em grande escala está muito limitado aos sistemas de PEG/dextrana e PEG/sal (fosfato, citrato ou sulfato). Devido estes sistemas apresentarem uma série de vantagens quando comparados a outros sistemas, como baixo custo de seus componentes, atoxidade, grande faixa de aplicação e menor tempo para separação (SARMENTO *et al.*, 1994).

2.4.1. Diagrama de fases do sistema de duas fases aquosas

Quando se misturam PEG, fosfato e água, acima de determinadas concentrações limites, forma-se um sistema de duas fases aquosas. A composição destes sistemas pode ser representada por um diagrama de fases (Figura 2.7). Para estes sistemas é utilizada a forma retangular sendo omitida a concentração do solvente, neste caso a água (ALBERTSSON, 1986). Assim, representa-se no eixo das abscissas a concentração do componente que se acumula na fase inferior e no eixo das ordenadas a concentração do componente que se acumula na fase superior.

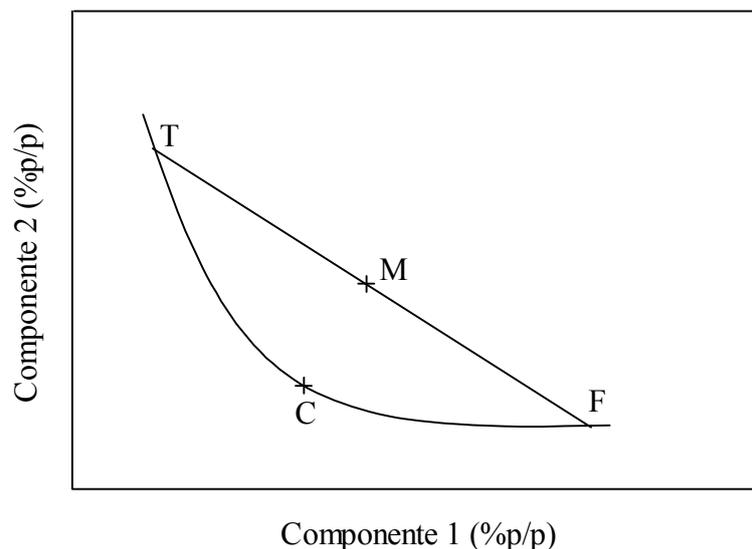


Figura 2.7. Diagrama de fase retangular.

A binodal (*TCF*) é a linha que define a separação entre a formação de uma ou duas fases homogêneas. Sistemas cuja composição fica abaixo da binodal formam uma

fase homogênea enquanto que sistemas cuja composição se situa acima da binodal formam duas fases homogêneas.

A composição inicial do sistema é dada pelo ponto M e a composição final de cada fase após atingir o equilíbrio é dada pelos pontos T (fase superior ou de topo) e F (fase inferior ou de fundo).

Os pares de pontos como T e F são chamados pontos nó, e o segmento \overline{TF} é chamado de linha de amarração (*tie-line length* - TLL). Todos os sistemas cuja composição inicial está contida nessa linha possuem a mesma composição de fase após o equilíbrio, porém com diferentes volumes entre as fases superior e inferior.

As “*tie-lines*” são caracterizadas pelo seu comprimento (TLL) e a inclinação (STL) (ALBERTSSON, 1986). O seu comprimento é determinado considerando a “*tie-line*” a hipotenusa de um triângulo, em que os catetos são formados pela diferença de concentração dos componentes nas duas fases. Assim:

$$TLL = \sqrt{(\Delta C_1)^2 + (\Delta C_2)^2} \quad (2.8)$$

em que, ΔC_1 e ΔC_2 representam a diferença de concentração dos componentes 1 e 2 entre as duas fases. A inclinação da “*tie-line*” é dada por:

$$STL = \Delta C_1 / \Delta C_2 \quad (2.9)$$

A razão entre as duas fases ($rTLL$) é dada por:

$$\frac{V_{topo} \times d_t}{V_{fundo} \times d_f} = \frac{\overline{MF}}{\overline{MT}} \text{ ou seja, } rTLL = \frac{V_{topo}}{V_{fundo}} = \frac{d_f}{d_t} \cdot \frac{\overline{MT}}{\overline{MF}} \quad (2.10)$$

onde, V_{topo} e V_{fundo} - volumes das fases superior e inferior, respectivamente.
 d_t e d_f - densidades das fases superior e inferior, respectivamente (MISTRY, 1996).

Outro ponto de suma importância no diagrama de fase é ponto C que é chamado de ponto crítico e a composição representada por ele é chamada de composição crítica (Figura 2.7). No ponto crítico as composições e os volumes das duas fases tornam-se, teoricamente, iguais. Assim, pequenas mudanças na composição total desse ponto C, fazem com que o sistema passe da região bifásica para região monofásica. Por isso os sistemas muito próximos ao ponto crítico requerem maior precisão e controle (ALBERTSSON, 1986).

2.4.2. Fatores que influenciam o S DFA

A partição entre duas fases depende de muitos fatores. É esperado que haja interações complexas entre a substância de interesse e os componentes de cada fase envolvendo pontes de hidrogênio, força de *Van de Waals*, interações entre cargas hidrofóbicas. Dessa maneira, a eficiência da partição depende dos seguintes fatores: peso molecular do polímero e da substância de interesse, tipo e concentração de componentes do sistema de duas fases aquosas, pH, temperatura, força iônica, tipo de sais utilizados no sistema, e presença de receptores para ligantes bioespecíficos (ALBERTSSON, 1986).

Os diferentes fatores que determinam a partição podem ser explorados separadamente ou em conjunto para uma separação efetiva. Alguns dos fatores podem ter uma maior influência na partição de um soluto passando a dominar o comportamento da partição. Com respeito à partição de substâncias, os seguintes tipos de partição podem ser definidos:

1. Partição de exclusão. O tamanho da molécula ou área superficial das partículas (ou moléculas) é o fator dominante.
2. Partição interação eletrostática. O potencial elétrico entre as fases é usado para separar as moléculas ou partículas de acordo com carga elétrica.
3. Partição por afinidade hidrofóbica. Propriedades hidrofóbicas de uma das fases do sistema são usadas para separação de acordo com a hidrofobicidade das moléculas ou partículas.
4. Partição afinidade bioespecífica. A afinidade entre sítios nas moléculas ou partículas e um ligante de afinidade específica em uma das fases do sistema (fase de polímero) é usada para separação (ALBERTSSON *et al.*, 1990).

A base para partição de um sistema de duas fases aquosas é a distribuição seletiva das substâncias entre as fases (SILVA; FRANCO, 2000). A distribuição é caracterizada pelo coeficiente de partição, K , definido como sendo a razão entre a concentração da substância de interesse na fase de topo (C_t) e a concentração da substância de interesse na fase de fundo (C_f), após o sistema ter atingido o equilíbrio:

$$K = \frac{C_t}{C_f} \quad (2.11)$$

Formalmente, o coeficiente partição pode ser separado em vários termos:

$$\ln K = \ln K^0 + \ln K_{exc} + \ln K_{elect} + \ln K_{hfob} + \ln K_{biof} \quad (2.12)$$

onde, que os índices exc, elect, hfob, e biof representam respectivamente as contribuições devidas à exclusão, hidrofobicidade, interação eletrostáticas e à afinidade específica. O termo K^0 inclui todos os outros efeitos (ALBERTSSON; JOHANSSON; TJERNELD, 1990).

2.4.3. Efeito da massa molecular e concentração

O tipo de polímero e sua massa molar exercem influência na partição de um soluto. A massa molecular do polímero exerce a seguinte influência; quanto mais alto peso molecular do PEG, mais favorável à fase salina torna-se a partição para a proteína. O oposto ocorre se há uma diminuição do peso molecular do polímero. Este comportamento pode ser interpretado em termos de exclusão uma vez que, o aumento da massa molecular do polímero corresponde ao aumento da densidade da solução. Deste modo, o volume livre e conseqüentemente o volume excluído vão diminuir, e o componente terá mais dificuldade em se acomodar nessa fase (ALBERTSSON; JOHANSSON; TJERNELD, 1990).

No caso da substância de interesse, quanto maior for a molécula, maior será a área de contato que interage com os componentes do sistema e conforme o tipo de interação, a partição para a molécula será mais favorável a uma das fases. Este fator é importante quando a separação de moléculas com massas molares significativamente diferentes. De modo geral o valor de K diminui com o aumento da massa molar da proteína.

No caso dos sistemas polímero-sal, a tensão interfacial apresenta diferença notável entre as duas fases, em virtude das diferentes propriedades físicas, sendo que a partição de moléculas pequenas é extremamente favorecida a uma das fases (VIDEIRA; AIRES-BARROS, 1994).

A concentração dos componentes do sistema e, portanto, as linhas de amarração afetam o K da seguinte maneira: geralmente quanto maior a distância das linhas de amarração ao ponto crítico, maior também é o valor de K obtido. Porém existem exceções à regra, como é o caso para a partição de células, no qual o K é maior

para sistemas próximos ao ponto crítico (SARMENTO *et al.*, 1994; VIDEIRA; AIRES-BARROS, 1994).

2.4.4. Efeito do pH e sais no S DFA

O pH é um importante fator na influência do K . Alterando o pH ocorrem mudanças nas distribuições de cargas para as proteínas, portanto para estas é importante trabalhar próximo ao ponto isoelétrico onde a somatória de cargas da mesma é praticamente nula (HUDDLESTON *et al.*, 1991).

No entanto, as mudanças de cargas das proteínas podem ser usadas para direcionar a partição. Para a curtinase, por exemplo, o K aumenta com o aumento do pH. O mesmo ocorre para citocromo b_5 . Isso ocorre devido ao deslocamento da curva binodal. Além disso, aumentando o pH, a concentração do ânion HPO_4^{2-} aumenta em relação ao ânion H_2PO_4^- o que aumenta o efeito do *salting-out* (fenômeno de expulsão devido ao tamanho PEG) fazendo com a curtinase e o citocromo b_5 migrem para a fase PEG (SEBASTIÃO; CABRAL; AIRES-BARROS, 1994; SARMENTO *et al.*, 1994).

O tipo de sal adicionado, bem como a concentração deste, também afeta o coeficiente de partição. Por exemplo, no sistema PEG 1000-fosfato, a substituição do fosfato de sódio por fosfato de potássio fez que o K para a enzima curtinase diminuísse. Esse fato pode ser explicado, pelo deslocamento da curva binodal devido à substituição dos cátions, sugerindo uma mudança no volume das fases e que o cátion de sódio é mais eficiente que o cátion potássio para exercer o efeito *salting-out* sobre o PEG. Quando foi utilizado o PEG 3350, ocorreu o inverso, e o valor de K aumentou com a substituição do fosfato de sódio por fosfato de potássio (SEBASTIÃO; CABRAL; AIRES-BARROS, 1994).

BORA *et al.* (2005) estudaram três composições de S DFA compostos por PEG 600 e Na_2SO_4 , $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ e MgSO_4 para extração do antibiótico cefalexina e 7-ADAC (ácido aminodeacetoxicefalosporinica). O coeficiente de partição apresentou a seguinte variação em relação aos sais $\text{Na}_2\text{SO}_4 > (\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4 > \text{MgSO}_4$. Com a diminuição do pH que variou de 8 a 5, foi verificado um decréscimo no coeficiente de partição. Este fato foi atribuído à natureza química dos beta-lactâmicos, uma vez que, o aumento do pH, a carga elétrica positiva diminuirá e assim há uma tendência na

formação do complexo do PEG com a espécie aniônica refletindo o aumento do coeficiente de partição.

2.4.5. Efeito da temperatura no S DFA

A temperatura afeta diretamente o diagrama de fase (MURUGESAN; PERUMALSAMY, 2005). Entretanto, o efeito da temperatura é muito diferente para diferentes SDFAs dependendo diretamente do tipo de polímero utilizado na formação do sistema. Para um sistema composto de polietileno glicol, fosfato de potássio e água o aumento da temperatura do sistema favorece a formação das duas fases, isto é, uma menor concentração do polímero ou de sal é necessária para separação das fases (GU, 2000). Além disso, aumento da temperatura diminui a viscosidade e conseqüentemente reduz o tempo de separação das fases acarretando em uma maior produtividade.

Estudos da partição do antibiótico ciprofloxacina por um sistema composto por PEG/Na₂SO₄ mostrou que apesar da temperatura apresentar efeito na partição do antibiótico, o efeito não foi significativo para uma melhora no coeficiente de partição (MOKHTARANI *et al.*, 2008).

2.4.6. Aplicação de planejamentos experimentais em S DFA

A separação de biomoléculas em duas fases depende da natureza do polímero e da sua massa molar, concentração do polímero e do sal, temperatura, e pH do sistema, juntos com o tamanho, carga e hidrofobicidade da molécula, que são as principais variáveis que interferem com o coeficiente de partição. As variáveis e mecanismos que causam a distribuição desigual das biomoléculas entre as fases são poucos conhecidos, mas regras empíricas têm sido desenvolvidas.

A utilização de planejamentos experimentais é uma ótima ferramenta para se conhecer os principais fatores relacionados com cada tipo de extração e tipo de biomolécula que se quer separar (PORTO, 2004).

COSTA; PESSOA JR; ROBERTO, (2000) avaliaram as influências de 5 parâmetros (pH, massa molar do PEG e concentração de PEG, concentração de fosfato e de NaCl) na partição do complexo xilanolítico em S DFA, usando um planejamento

experimental 2⁵. A análise estatística dos resultados mostrou que as variáveis: massa molar do PEG, concentração de PEG e concentração de NaCl exerceram um efeito significativo sobre o valor do coeficiente de partição.

MARCOS *et al.* (2002) otimizaram a purificação da penicilina acilase utilizando o sistema PEG/citrato de sódio através de um planejamento experimental fatorial 2³ onde as variáveis trabalhadas foram às concentrações de PEG 3350, citrato de sódio e NaCl. As análises das superfícies resposta em função do rendimento e fator de purificação demonstraram que os três fatores exercem efeitos sob os parâmetros estudados. O máximo fator de purificação obtido foi 6,5 tendo como condições para PEG 3350, citrato de sódio e de NaCl concentrações 15,1%, 11,0% e 8,52%, respectivamente. No entanto, nestas condições, o rendimento previsto é de 61 %. As melhores condições entre estes dois parâmetros foram encontradas através da sobreposição dos gráficos de contorno do fator de purificação e rendimento. Com um fator de purificação superior 5,5 com rendimentos superiores a 80%.

MAYERHOFF; ROBERTO; FRANCO, (2004) utilizaram um planejamento experimental 2⁴ para avaliar a influência das variáveis: massa molar do PEG, concentração do PEG, concentração de fosfato e concentração de NaCl na extração de xilose redutase utilizando sistemas de duas fases aquosas. Os autores obtiveram também modelos quadráticos para o fator de purificação e rendimento e os valores máximos previstos por estes modelos foram $1,59 \pm 0,40$ e $105,8 \pm 26,2\%$, respectivamente. O maior valor para coeficiente de partição foi previsto para um sistema com PEG 1000 e TLL 34. O K , fator de purificação e rendimentos (R) cujos valores correspondentes a 21,2, 1,9 e 103,5%, respectivamente, também foram obtidos em condições experimentais.

A elaboração de planejamentos experimentais tem sido de fundamental importância nestes estudos, pois reduziu o número de experimentos necessários, indicando as principais variáveis que interferem significativamente no SDFa e ainda indicam os efeitos de interação entre as variáveis (PORTO, 2004; RODRIGUES; IEMMA, 2005).

2.4.7. Processos contínuos de S DFA

A extração de biomoléculas através do S DFA utilizando o processo em batelada é bastante difundida entre os estudos encontrados na literatura (VIDEIRA; AIRES-BARROS, 1994; TANUJA *et al.*, 1997; COSTA; PESSOA JR; ROBERTO, 2000; CHAVES *et al.*, 2000; HARAGUCHI *et al.*, 2004; SILVA *et al.* 2008).

Na tentativa de reduzir o tempo gasto, reduzir custo e evitar possível degradação da biomolécula, a forma contínua do processo de extração por S DFA apresenta-se, assim como todos os processos de engenharia química, como a melhor alternativa, sendo então passível de estudo.

KAUL *et al.* (1995) estudaram a cinética separação das duas fases do S DFA utilizando PEG 4000 e dois separadores verticais, um de pequena escala (10 mL) e outro de grande escala (2 L). Os autores concluíram que altura da dispersão das fases do S DFA independe das dimensões geométricas do separador. Estes resultados são extremamente importantes para o projeto de separador de grande escala das duas fases aquosas e para sistemas contínuos.

MISTRY *et al.* (1996) desenvolveram um modelo matemático para descrever a cinética de separação das duas fases do S DFA composto de PEG e sal de fosfato para extração de proteínas com adição de NaCl ao sistema. O modelo foi baseado a partir do balanço de massa no estado estacionário dos principais componentes e parâmetros de equilíbrio de fase.

$$\frac{dh}{dt} \frac{\mu_c}{\sigma} = a \times \left(\frac{\mu_d}{\mu_c} \right)^b \times \left(\frac{\sigma_w}{\sigma} \right)^c \times \left(\frac{\Delta\rho}{\rho_c} \right)^d \quad (2.12)$$

onde h altura da dispersão; μ_c é a viscosidade da fase continua; μ_d é a viscosidade da fase de dispersão; σ tensão superficial da fase de dispersão entre as duas fases; σ_w tensão superficial da água a 20° C; $\Delta\rho$ diferença de densidade entre as duas fases; ρ_c densidade da fase continua; a , b , c e d são constantes.

O comportamento do coeficiente de partição da proteína em função da concentração de NaCl no S DFA foi ajustado o modelo sigmoidal de Boltzman:

$$\log(K) = \frac{G_1}{1 + \exp\left\{\frac{(NaCl - G_3)}{G_4}\right\}} - G_2 \quad (2.13)$$

onde G_1 , G_2 , G_3 e G_4 são constantes do modelo sigmoidal de Boltzman.

Para os contaminantes em função da concentração de NaCl foi utilizado modelo abaixo:

$$\log K = E_1 NaCl + E_2 \quad (2.14)$$

onde E_1 , E_2 são constantes.

O modelo apresentado pelos autores foi estendido para o processo contínuo. O processo contínuo foi composto de dois estágios de separação: o primeiro estágio de separação principal tinha como objetivo a remoção de contaminantes e segundo estágio ocorrem à extração da fase sal com produto (proteína) e reciclagem do PEG (Figura 2.8). O estudo de caso dos pesquisadores foi à extração da α -amilase no SFDA de PEG 4000/fosfato. Com base nos resultados autores concluíram que o ajuste dos parâmetros do modelo tanto para processo batelada e contínuo permitiram boa reprodutibilidade em relação aos valores experimentais.

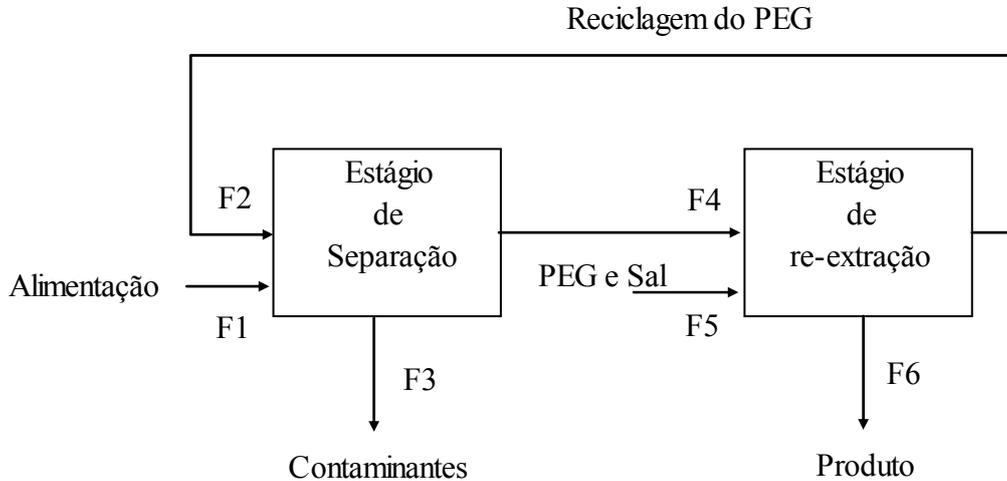


Figura 2.8. Esquema do processo contínuo utilizado por MISTRY *et al.* (1996).

SALAMANCA *et al.* (1998) realizaram estudo do efeito da relação entre os volumes de fase ($rTLL$) na cinética de separação de fase em processo em batelada do SDFA composto por PEG 1500 e sulfato para extração do extrato de *Bacillus subtilis*. Para o sistema em batelada os autores constataram que a separação das fases é muito mais rápida quando a fase de fundo é maior, neste caso a presença ou ausência do extrato de *Bacillus subtilis* apresenta pouca influência no tempo de separação. Quando a

fase de topo o *rTLL* tem um efeito importante, quanto maior a fase de topo mais lento a separação de fase. A presença de extrato de *Bacillus* também faz com que a separação das fases seja mais lenta. Os autores projetaram três separadores horizontais contínuos com diferentes geometrias de entrada e utilizaram um S DFA composto por PEG 4000 e sulfato para estudos (Figura 2.9). Os diferentes projetos dos separadores contínuos tiveram pouco efeito na separação das fases e no ajuste global do sistema. Como no sistema em batelada a presença do extrato de *Bacillus* diminui a velocidade de separação das fases.

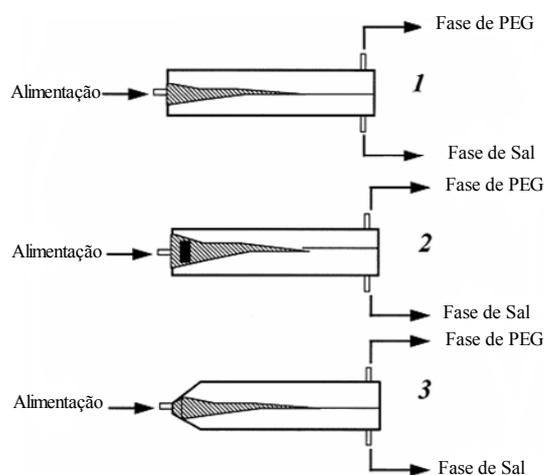


Figura 2.9. Geometrias de entrada do separador horizontal para o S DFA projetado por SALAMANCA *et al.* (1998): 1) quadrado; 2) quadrado com defletor; 3) cônica.

SOLANO-CASTILLO; RITO-PALOMARES (2000) estudaram o efeito da altura/diâmetro (H/D) em relação à cinética de separação das fases em S DFA. Os autores investigaram também a presença de suspensões biológicas na cinética de separação. O sistema de duas fases aquosas era composto por 23% (m/m) de PEG 1000 e 18% (m/m) de fosfato a pH 8,5. Os autores observaram que o tempo de separação de fase é muito mais rápido quando utiliza uma suspensão com células rompidas. A adição de suspensões não diluídas para S DFAs reduz a velocidade do processo de separação de fase. Quando se utiliza um separador vertical com uma área de seção transversal grande (relação de H/D menor que um), as fases se separaram muito mais rápido que em um separador vertical com uma relação de H/D maior que um.

CUNHA *et al.* (2003) utilizaram o SFDA de PEG3350/fosfato para extração da proteína cutinase (WP)₂ do caldo de cultivo e compararam o modo de operação contínuo num recipiente com contacto com disco giratório perfurado (Figura 2.10) (*perforated rotating disc contactor* - PRDC) com o modo de extração em batelada. O modo contínuo proporcionou um aumento de rendimento 36% para 83% e um aumento da capacidade de extração de 2,5 vezes maior em relação ao modo de extração em batelada.

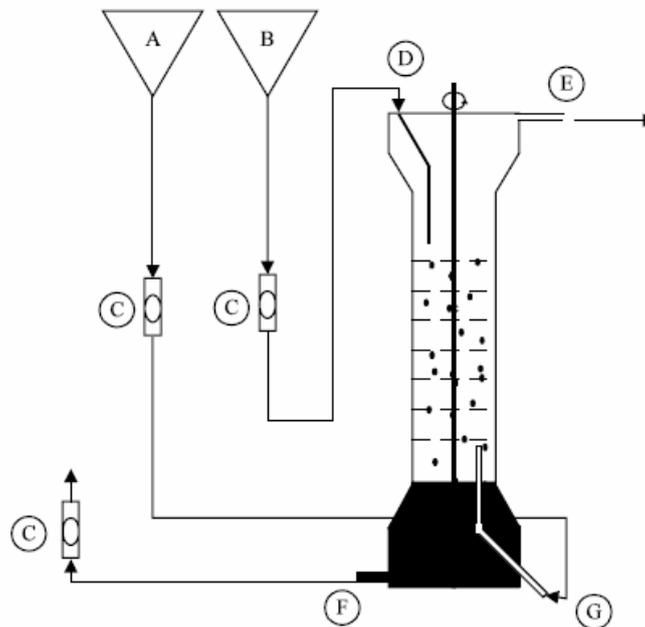


Figura 2.10. Esquema experimental utilizado por CUNHA *et al.* (1993): (A) alimentação de PEG; (B) alimentação da solução de fosfato; (C) rotâmetro; (D) entrada da fase pesada; (E) retirada da fase de topo; (F) retirada da fase de fundo; (G) entrada da fase leve.

IGARASHI; KIECKBUSCH; FRANCO (2004) estudaram a possibilidade da extração da enzima xilanase através do processo contínuo de SFDA de PEG 4000/fosfato, utilizando uma coluna de recheio e compararam com os pratos perfurados. Utilizaram três tipos de recheio: anéis de *Rasching*, esferas de vidro e anéis de poliestireno. A coluna de recheio apresentou melhor coeficiente de transferência de massa, que a coluna de pratos perfurados. O melhor resultado obtido para com a coluna recheada de anéis de poliestireno, onde obtiveram 94% de recuperação da enzima xilanase.

Um modelo matemático baseado no balanço de massa de também foi proposto por SIMON; GUATAM (2004), para permitir análise no estado estacionário e transiente do sistema de duas fases aquosas operando continuamente; como segue:

a) Equação da continuidade total:

$$\frac{d(V_T + V_B)}{dt} = F_{in} - F_T - F_B \quad (2.15)$$

onde V_T e V_B são volume de topo e fundo, respectivamente; F_{in} é o fluxo de entrada, F_T é o fluxo de saída da fase de topo; F_B é o fluxo de saída da fase de fundo.

b) Balanço para cada espécie:

$$\frac{d(V_T C_{i,T} + V_B C_{i,B})}{dt} = F_{in} C_{i,in} - F_T C_{i,T} - F_B C_{i,B} \quad (2.16)$$

onde a variável $C_{x,y}$ representa a concentração do componente x , no fluxo de y .

Para o modelo desenvolvido foi verificado mais equações que variáveis desconhecidas. Assim, utilizando o método de mínimos quadrados para resolver as equações. O modelo foi validado com base no sistema composto de cloreto de sódio, e uma proteína contaminante, na qual a molécula alvo para isolamento era a taumatina. Para o estado estacionário e transiente, um procedimento de otimização através da Caixa de ferramentas de Otimização *Matlab* (MathWork, Inc.) foi implementado. O método de Euler's foi usado no caso transiente para discretizar as equações diferenciais. As concentrações de estado estacionário concordaram com dados experimentais e com os últimos valores de concentrações obtidos no caso transiente. O modelo baseado no balanço de massa foi simulado para instigar as respostas obtidas diante de uma perturbação negativa em 4 % na vazão de entrada e das concentrações dos componentes. A análise mostrou que as variáveis, como as concentrações de cloreto de sódio e sal de fosfato se estabelecem aos valores finais em períodos de tempo diferentes. Os autores concluíram que a proposta pode ser usada para projetar um sistema de controle para extração bifásica contínua para aplicações industriais.

2.4.8. Recuperação e reciclagem das substâncias que formam o SDFa

A reciclagem das substâncias que constituem o SDFa pode reduzir os custos do processo, bem como diminuir as despesas para o tratamento das substâncias

químicas envolvidas. A reciclagem de polímeros compreende, na prática, o reciclo do PEG. Quando a fase rica em PEG contém a biomolécula pode se realizar uma desproteinização parcial da fase rica em PEG através da ultrafiltração (UF) (GUAN *et al.*, 1995; WU *et al.*, 2000).

Um método alternativo é a adsorção da biomolécula na fase rica em PEG através de adsorventes adequados, recuperando assim a fase rica em PEG. No entanto, HIRATA (2003), avaliou a possibilidade da reciclagem da fase rica em PEG de um SDFa em equilíbrio formado de AC e PEG/fosfato, utilizando PEG 400 a pH 6 e uma resina de troca iônica Amberlite IRA-400Cl, verificou-se que não houve adsorção significativa do AC pela resina durante o tempo de 30min estudado em um banho finito.

A cromatografia de exclusão também poder ser um método efetivo para a separação de biomolécula da fase PEG, embora este método seja caro e exige longo tempo de operação. A Cromatografia em coluna de leito fixo de troca iônica da solução de PEG/biomolécula sofre uma alta pressão devido à viscosidade alta da solução (RAGHARAVAO *et al.*, 2003).

Quanto ao sal presente na fase de fundo, pode ser removido através de diálise (WU *et al.*, 2000; WU *et al.*, 2001) ou sal pode ser concentrado por ultrafiltração e posteriormente reutilizado na segunda etapa de extração, para caso de um processo de múltiplos estágios.

2.5. Processo de cromatografia

O processo de cromatografia é uma técnica bastante usada na purificação e concentração de biomoléculas. O processo de cromatografia consiste na separação de um soluto entre uma fase móvel e outra estacionária. Comumente a fase fluida (adsorptivo) é colocada em contato com a fase sólida (adsorvente) e na interface de separação entre as duas fases ocorre uma fonte de atração entre adsorvente e algumas das espécies químicas presente na fase fluida (adsorbato). Essa interface apresenta-se, portanto como “concentrador” dessas espécies químicas da fase fluida (COLLINS, 2007).

O processo de cromatografia para separação de biomoléculas pode ser subdividido basicamente em quatro tipos:

a) Cromatografia de exclusão molecular: promove separação das proteínas com diferentes tamanhos que são geralmente proporcionais ao peso molecular. A separação consegue-se usando uma matriz porosa, na qual as moléculas têm diferentes estados de acesso (moléculas pequenas têm maior acesso que as grandes). A amostra é eluída por ordem decrescente de tamanho. Este tipo de cromatografia também é conhecido como “filtração em gel” ou “cromatografia em peneira molecular”, que pode ser facilmente aplicável em grande escala, mantendo a altura da matriz e aumentando o seu diâmetro (ROTHSCHILD, 2007).

b) Cromatografia de afinidade: baseia-se na interação específica entre um determinado ligando e a proteína. A elevada especificidade e capacidade da cromatografia de afinidade permitem o uso de elevadas velocidades de fase móvel, utilização de grande volume de amostra, purificação de proteínas a partir de misturas biológicas em apenas uma etapa. A aplicação de cromatografia de afinidade em grande escala constitui uma área de crescente importância em biotecnologia (KAMIMURA; MAUGERI, 2005, SPADARO; FONSECA, 2007b).

c) Cromatografia de interação hidrofóbica: baseia-se na interação hidrofóbica ou na associação entre proteínas e ligantes hidrofóbicos imobilizados em suporte sólido. A maioria das proteínas contém alguns aminoácidos hidrofóbicos (alanina, fenilalanina, valina, triptofano, leucina, isoleucina, tirosina, prolina). As proteínas ordenam-se em soluções aquosas para atingir o mínimo de energia, colocando muitos dos seus grupos hidrofóbicos voltados para interior da molécula e os grupos com carga, a para o exterior. Alguns grupos hidrofóbicos que ficam expostos originam regiões hidrofóbicas disponíveis para se associar aos grupos hidrofóbicos de uma matriz. A diversidade de condições de eluição possíveis permite a resolução de misturas complexas de proteínas, difíceis de purificar por outras técnicas cromatográficas. A presença de contaminantes hidrofóbicos na amostra diminui a eficiência do processo. (MAUGERI; TABOADA, 2005).

d) Cromatografia de troca iônica: baseia-se na distribuição de cargas das biomoléculas. As biomoléculas são adsorvidas nas resinas de trocadoras de íons por ligações eletrostáticas entre cargas opostas da superfície da proteína e o grupo carregado do adsorvente. Os suportes cromatográficos (resina) dividem-se em aniônicos e catiônicos. Os primeiros possuem ligantes carregados positivamente; segundo o grupo dos catiônicos os ligantes estão carregados negativamente. A capacidade desses

suportes depende da concentração dos grupos iônicos e da porosidade do suporte, verificando-se exclusão molecular ou uma difusão dificultada das biomoléculas nos poros de pequeno diâmetro (KILIKIAN; PESSOA JR, 2001).

Segundo SLEIJKO (1985) dentre esses quatro tipos de processo de cromatografia o mais comumente empregado na separação de biomolécula é a cromatografia de troca iônica.

2.5.1. Resinas de troca iônica

Há uma variedade de matrizes, grupos funcionais e condições de adsorção/dessorção disponíveis para purificação de biomoléculas. No referente às matrizes estas podem ser constituídas por resinas ou polímeros hidrofóbicos de poliestireno, polímeros macroporosos hidrofílicos naturais ou sintéticos, como poliacrilamida, celulose, dextrana e agarose.

A escolha da matriz de adsorção deve possuir as seguintes propriedades: ser mecânica e quimicamente estáveis sob condições de acoplamento, às variações de pH, força iônica, temperatura e a agentes desnaturantes, como uréia; preferencialmente uniformes, esféricas, rígidas e porosas, para exibir boas propriedades de vazão; alta capacidade de adsorção, para diminuição do leito e maximizar a velocidade de operação (SPADARO, 2007a; PESSOA JR, 2005).

Para as resinas de troca iônica são fixados grupos iônicos por uma ou mais reações químicas. Como já mencionado anteriormente as resinas de troca iônica se dividem em aniônicas e catiônicas, e estes grupos podem ser classificados em fracos ou fortes, dependendo dos valores de pKa dos grupos carregados. Os grupos fracos possuem faixa mais estreita de pH em que operam com eficiência e são, muitas vezes, empregados na forma parcialmente ionizada e os grupos fortes são os que têm a capacidade de permanecer na forma ionizada nas condições de pH normalmente usadas para a purificação de proteínas. É importante salientar que os termos fortes e fracos não estão relacionados à força de interação entre a proteína e a matriz.

Na Tabela 2.1, são relacionados exemplos de alguns tipos de trocadores iônicos comerciais, sendo classificados quanto à força do grupo de trocador (ânions fortes, ânions fracos, cátions fortes e cátions fracos).

Tabela 2.1. Exemplos de alguns tipos de trocadores disponíveis comercialmente. Tabela adaptada de SPADARO (2007a).

Estrutura	Designação	Denominação	Nomes comerciais
Ânions fortes			
$\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$	Q	Amônio quaternário	Q-Sepharose ¹ ; Amberlite: IRA-400 ³
$\text{C}_2\text{H}_4\text{N}^+(\text{C}_2\text{H}_5)_2\text{CH}_2\text{CHOHCH}_3$	QAE	Dietil(2-hidroxiopropil) aminoetil	QAE-Sephadex ¹ ; QAE-550C ²
Ânions fracos			
$\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}^+\text{H}(\text{C}_2\text{H}_5)_2$	DEAE	Diethylaminoetil	DEAE-Sephadex ¹ ; DEAE-650 ²
$\text{R}'\text{-N}^+\text{-H}_2$	-	Poliamina/ Alquilamina	Amberlite ¹ : IRA 96; Dowex ³ : M-43
Cátions fortes			
SO_3	S	Sulfônico	Amberlite ¹ : IR 122; Dowex ³ : 50W-X8
$\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3$	SP	Propilsulfônico	SP-Sephadex ¹ ; SP-Sepharose ¹
Cátions fracos			
COO	C	Carboxílico	Amberlite: CG 50 T
CH_2COO	CM	Metilcarboxílico	CM-Sepharose ¹ ; CM-Bio-Gel ²

Fabricantes: 1: Amersham Biosciences (comercializado por GE Healthcare); 2: Bio-Rad; 3: Sigma-Adrich.

Na escolha dos grupos funcionais, o pH é uma variável que precisa ser considerada, desde que as proteínas possuem tanto uma carga líquida positiva quanto negativa, dependendo do pH do meio e de seu ponto isoelétrico. Portanto, pode ser usado tanto trocador aniônico quanto catiônico. A escolha depende da estabilidade da proteína em função do pH a ser utilizado: quando esta for mais estável em pH abaixo do seu ponto isoelétrico, usa-se um trocador catiônico (PESSOA JR, 2005).

2.5.2. Equilíbrio de adsorção

A adsorção de uma substância, presente em uma fase, na superfície de outra fase em um sistema específico leva a uma distribuição definida termodinamicamente desta substância entre as fases quando o sistema atinge o equilíbrio, ou seja, quando não ocorre mais adsorção. Uma maneira comum de descrever essa distribuição é expressar a quantidade de substância adsorvida por quantidade de adsorvente (q^*) como uma função da concentração de adsorbato (C^*) em solução. Uma expressão desse tipo é denominada isoterma de adsorção.

As relações de equilíbrio são apresentadas em forma de modelos que correlacionam matematicamente às quantidades adsorvidas em equilíbrio com o meio circundante. Alguns desses modelos são descritos a seguir:

a) Modelo de Langmuir

Uma das isotermas clássicas apresentadas na literatura provém da teoria de Langmuir, que assume a formação de uma camada homogênea na superfície sólida, sem que haja interações entre as moléculas adsorvidas. A representação matemática desta isoterma é apresentada na equação a seguir.

$$q^* = \frac{q_m \times C^*}{K_D + C^*} \quad (2.17)$$

onde C^* é a concentração da espécie em solução que está em equilíbrio com a quantidade adsorvida q^* , K_D é a constante de equilíbrio e q_m é a máxima capacidade de adsorção.

Essa isoterma assume calor de adsorção constante, um número finito de sítios e a existência de ponte de interação entre soluto-soluto, resultando em um recobrimento em monocamada (DUTTA; BORAH; DUTTA, 2004).

b) Modelo de Freundlich

O modelo de Freundlich corresponde à adsorção em sítios não uniformes. Nesse caso o calor de adsorção frequentemente diminui com o aumento da cobertura na superfície. A falta de uniformidade pode existir previamente nos diferentes sítios de adsorção ou ser causada pelas forças repulsivas entre átomos ou moléculas adsorvidas. A Equação abaixo descreve matematicamente esta isoterma:

$$q^* = K_F \times C^{*n} \quad (2.18)$$

onde K_F é a constante da isoterma de Freundlich e n é um índice desta isoterma. O valor de n reflecte o grau de heterogeneidade da superfície ($n > 1$ quando a isotérmica é favorável e $n < 1$ no caso de isotérmica desfavorável). A equação (2.18) assume que a quantidade adsorvida tende para infinito, correspondendo à formação de multicamadas de moléculas adsorvidas. A isotérmica de Freundlich tem a desvantagem de ajustar bem os dados experimentais apenas numa faixa de concentrações moderadas do soluto (DUTTA; BORAH; DUTTA, 2004).

c) Modelo Linear

O modelo linear é o modelo mais simples de isoterma, que descreve uma adsorção linear descrita pela equação:

$$q^* = K_L \times C^* \quad (2.19)$$

onde, K_L é a constante da isoterma linear.

Esse modelo tem a vantagem de descrever um dado conjunto de dados de adsorção em termos de um único parâmetro, K_L . Porém é raramente válida para grandes variações de concentração, portanto não se devem fazer extrapolações utilizando este modelo (DUTTA; BORAH; DUTTA, 2004).

d) Modelo de Toth

O modelo Toth pode ser uma alternativa para obter uma melhor concordância com os pontos experimentais em todo intervalo de variação da concentração. O modelo de Toth é expresso pela equação:

$$q^* = \frac{q_m \times C^*}{(b + C^n)^{1/n}} \quad (2.20)$$

sendo q_m a capacidade de adsorção, b um parâmetro relacionado com a afinidade para com o adsorvente e n um parâmetro relacionado com o grau de heterogeneidade da superfície (DUTTA; BORAH; DUTTA, 2004).

c) Modelo de Nitta

O modelo de Nitta considera que uma molécula pode ocupar múltiplos sítios numa superfície homogênea e é definida pela equação,

$$\theta = K_N \times C^* \times (1 - \theta)^n \quad (2.21)$$

em que $\theta = q/q_m$, K_N e n são constantes.

d) Modelo de Elovich

A equação que define o modelo de Elovich é baseada no princípio cinético que assume que o aumento de locais de adsorção exponencialmente com adsorção em multicamadas de adsorção (HAMDAOUI; NAFFRECHOUX, 2007). É expressa pela relação:

$$q^* = q_m \times K_E \times C^* \times \exp\left(-\frac{q^*}{q_m}\right) \quad (2.22)$$

onde K_E e q_m são constantes.

2.5.3. Aspectos gerais da adsorção em leito fixo

Os processos e separação que utilizam à técnica de adsorção podem ser operados basicamente de duas formas: através de bateladas cíclicas leito fixo ou através de processo contínua. No caso de processos biotecnológicos o processo de adsorção em leito fixo é comumente mais utilizado na indústria.

Na adsorção em leito fixo, as concentrações na fase fluida e na fase sólida mudam com o tempo bem como com a posição do leito. Primeiramente, a maior parte da transferência de massa ocorre na entrada do leito, onde, primeiro, o fluido entra em contato com o adsorvente. Se o sólido não contém adsorbato no começo, a concentração no fluido cai exponencialmente para zero antes do final do leito. Este perfil de concentração é mostrado pela curva t_1 na Figura 2.11(a), onde C/C_0 é a concentração do fluido relativa à alimentação. Após alguns minutos, o sólido perto da entrada é saturado, e a maior transferência de massa ocorre a uma distância maior da entrada. A região onde há uma maior mudança na concentração é chamada de zona de

transferência de massa, e os limites estão geralmente entre valores de 0,95 até 0,05 de C/C_0 . Com o tempo a zona de transferência de massa move-se até o final do leito, como mostra os perfis t_3 e t_4 (McCABE; SMITH; HARRIOTT, 1993).

Os perfis apresentados na Figura 2.11(a) podem prever a curva de concentração do fluido deixando o leito em função tempo, obtendo assim a curva de saturação (*breakthrough curves*) mostrada na Figura 2.12(b). No tempo t_1 , t_2 e t_3 , a saída da concentração é praticamente zero. Quando a concentração atinge o ponto de ruptura a alimentação interrompida. O ponto de ruptura (*breakpoint*) geralmente ocorre com a concentração relativa de 0,05 ou 0,10 (McCABE; SMITH; HARRIOTT, 1993).

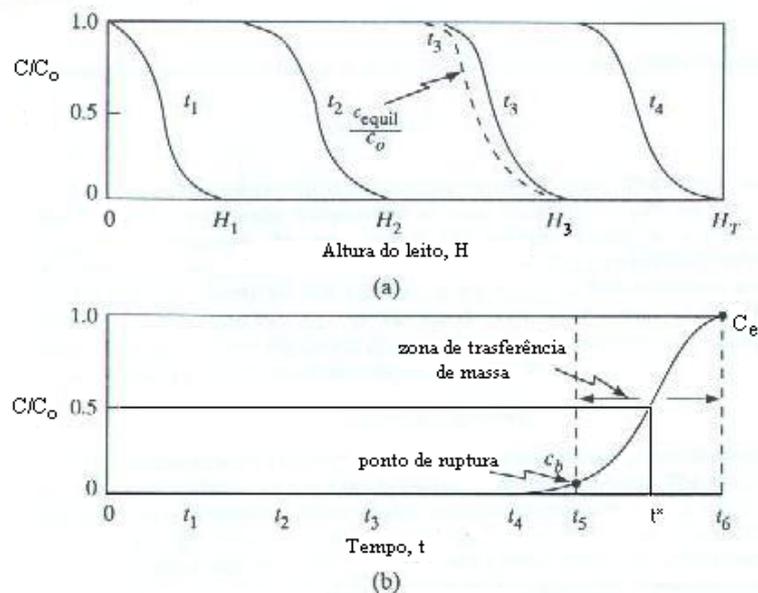


Figura 2.11. (a) Perfis de concentração e (b) Curva de saturação para adsorção em leito fixo. Figura adaptada de McCABE; SMITH; HARRIOTT (1993).

2.5.4. Purificação de ácido clavulânico utilizando troca iônica

O AC é produzido em cultura submersa por microrganismo *Streptomyces clavuligerus* e purificado através de uma série de passos, dos quais os mais importantes são a separação por extração líquido-líquido e/ou adsorção.

A patente US4110165 descrita por COLE; HOWARTH; READING (1978) descreveu que o ácido clavulânico pode ser extraído do caldo de fermentação através de vários métodos em que se utiliza a filtração. No processo de extração por solvente a solução filtrada deve ser resfriada e o pH abaixado até a região entre 2 e 3, pela adição

de ácido, enquanto esta solução é misturada com um solvente orgânico como acetato de n-butila ou n-butanol ou acetato de etila.

Depois da separação de fases, por centrifugação, o AC é extraído do solvente orgânico com uma solução de tampão fosfato ou bicarbonato de sódio a um valor de pH em torno de 7,0. Esse extrato aquoso pode ser concentrado por pressão reduzida gerando um sal de AC. Esse sal é estável quando armazenado como um sólido seco à -20° C. Quando se utiliza o processo com resina de troca iônica, o filtrado, com pH entre 6 e 7, é percolado em uma coluna empacotada, com resina de troca iônica do tipo Amberlite IR4B ou Zerolite FFIF, até a saturação. A etapa de lavagem da coluna é feita com água e a eluição é realizada com uma solução de cloreto de sódio.

Dois procedimentos clássicos foram sugeridos por BUTTERWORTH (1984) que se baseou no trabalho de Reding & Cole de 1977. Ao final da fermentação o caldo é clarificado por filtração ou centrifugação e o micélio de *Streptomyces clavuligerus* é descartado. No primeiro método, o caldo tem seu pH reduzido e a extração do AC é feita com solvente orgânico. A fase orgânica é re-extraída com solução de NaOH em pH 7. O extrato obtido é passado por uma resina Amberlite XAD-4 para desmineralizar o meio, sendo então obtido o clavulanato de sódio. No segundo método, o caldo é passado por uma resina de troca aniônica e eluído com solução salina, seguindo-se as etapas de adsorção em resina Amberlite XAD-4 e Zerolite SRA 62. Segundo o autor o meio é desmineralizado em resina Amberlite XAD-4. O produto final apresenta alto teor de pureza e é obtido por liofilização ou por cristalização na solução aquosa. Ao final do processo um produto de alto grau de pureza é obtido por liofilização ou cristalização da solução aquosa.

MAYER; ANSPANCH; DECKWER, (1996) mostraram que existe uma fraca interação entre o AC e a superfície apolar das resinas Amberlite XAD-4 e XAD-2, não sendo possível, desta maneira, recuperar AC por adsorção não específica. Assim, um novo sistema com base na formação de um par iônico foi desenvolvido. Nesse sistema as resinas do tipo apolar foram testadas em combinação com sais de amônio quaternário possuindo diferentes polaridades e formando pares iônicos com o grupo ácido da molécula de AC. Para se comparar o desempenho desse sistema foram feitos testes com uma tradicional resina de troca iônica, Amberlite IRA-400Cl. Os autores constataram que o uso da cromatografia com formação de par iônico é uma alternativa viável e eficiente na purificação de AC. Este artigo é um dos poucos que apresenta resultados

tais como rendimento, e fatores de concentração e purificação. Os autores chegaram a um fator de concentração de 2,0 e fator de purificação de 1,64 com rendimentos que não passaram de 65 % para adsorção de AC. A principal desvantagem do sistema que utiliza a formação do par iônico é a presença do próprio sal de amônio quaternário na solução eluída tendo que ser separado do AC na seqüência.

No que se refere ao processo de adsorção do AC por troca iônica da resina Amberlite IRA-400Cl, todos os aspectos cinéticos, de transferência de massa e termodinâmicos durante a adsorção foram estudados por BARBOZA; ALMEIDA; HOKKA (2002a), BARBOZA; ALMEIDA; HOKKA (2002b) e BARBOZA; ALMEIDA; HOKKA (2003).

A resina de troca iônica Amberlite IRA-400 Cl foi utilizada por ALMEIDA *et al.* (2003) em seu estudo de um processo contínuo para purificação de AC utilizando dois reatores de mistura (CSTR) com reciclo da resina. Este trabalho buscou obter condições de operação que maximizassem o rendimento e os fatores de concentração (*FC*) e purificação (*FP*). Obteve-se um rendimento de até 90%, maior que os dados encontrados na literatura. Entretanto, quando comparado com o processo em leito fixo, com a mesma resina, o processo contínuo apresentou *FC* e *FP* menores, sendo os máximos encontrados de 0,28 e 1,57 respectivamente.

2.6. Considerações finais

Os vários tópicos abordados proporcionaram uma idéia de alguns processos de separação e purificação de biomoléculas.

Com relação ao processo de separação e purificação do AC utilizando S DFA poucos trabalhos foram realizados, dentre os quais se podem destacar os de VIDEIRA; AIRES-BARROS (1994) e HIRATA (2003). Ambos os trabalhos fizeram uso do processo em batelada, contudo os estudos não são conclusivos a respeito das condições de operação tais como, massa molar, concentração do polímero e do sal, temperatura, e pH do sistema, os quais são fundamentais para desenvolvimento do processo de separação utilizando S DFA. Nestes trabalhos não foram apresentados nenhum procedimento para se re-extrair o AC da fase de topo do S DFA rica em PEG. Neste sentido, entendeu-se que havia necessidade de uma otimização do processo de extração do AC pelos S DFA, envolvendo o estudo do efeito da temperatura no sistema, bem

como o estabelecimento de uma metodologia para a re-extração do AC. Estes estudos devem fornecer subsídios para que se proponha um processo no qual sejam estabelecidas às condições operacionais adequadas.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Materiais

3.1.1. Caldo de ácido clavulânico

Os ensaios foram realizados com caldos produzidos por fermentação com *Streptomyces clavuligerus* ATCC 27064, cujos meios de cultura são essencialmente constituídos de glicerol, isolado protéico de soja (SUPROR 783), suplementação de ornitina, solução de sais e KH_2PO_4 , a 28° C (TEODORO *et al.*, 2005).

Com relação à composição do meio, a exceção em alguns ensaios, cuja composição apresenta a mesma composição de TEODORO *et al.*, (2005), porém sem adição de ornitina sendo suplementado por óleo de soja e tendo o isolado protéico SUPROR 783 substituído por farinha de soja (Prosan), tal como descrito por ORTIZ; HOKKA; BADINO (2006).

Ao fim da fermentação os caldos tiveram seu pH ajustado para 6,2 com ácido fosfórico 18 N, sendo resfriados nas temperaturas de 11 ou 20° C, feitos passar por membranas de microfiltração e os permeados desta etapa foram utilizados nos estudos de ultrafiltração em conjunto com a extração do sistema de duas fases aquosa.

3.1.2. Resinas de troca iônica

Duas resinas aniônicas foram utilizadas para os experimentos de adsorção por troca iônica:

- a) Resina Streamline Q XL da Amersham biosciences;
- b) Resina Amberlite IRA-400 Cl da Sigma-Adrich.

Ambas as resinas foram testadas na re-extração do AC da fase rica em PEG no SDFa, sendo a resina Streamline Q XL testada também na adsorção do AC contido no caldo pré-tratado por membranas.

3.1.3. Reagentes e compostos utilizados

Os principais reagentes e compostos utilizados ao longo do trabalho estão apresentados na Tabela 3.1.

Tabela 3.1. Tabela de reagentes utilizados no trabalho.

Reagente		Fornecedor
PEG 400	$\text{HO}(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_n\text{H}$	Synth
PEG 600	$\text{HO}(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_n\text{H}$	Fluka, BioChemika
PEG 1000	$\text{HO}(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_n\text{H}$	Fluka, BioChemika
PEG 4000	$\text{HO}(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_n\text{H}$	Merck
PEG 6000	$\text{HO}(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_n\text{H}$	Merck
Cloreto de bário	$\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Synth
Cloreto de sódio	NaCl	Quemis
Iodo	I_2	---
Acido perclórico	HClO_4	Nuclear
Sulfato de hidrazina	$\text{H}_6\text{N}_2\text{O}_4\text{S}$	Merck
Molibdato de amônio	$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	Merck
Imidazol	-----	GE Healthcare
Fosfato de Potássio monobásico	KH_2PO_4	Quemis
Fosfato de Potássio bibásico	K_2HPO_4	Quemis
Hipoclorito de sódio	NaClO	Audax
Acido acético glacial	CH_3COOH	Quemis
Álcool etílico	$\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$	Quemis

3.1.4. Membranas de microfiltração

Na etapa de purificação primária do caldo fermentativo e nos ensaios para o cálculo da resistência da membrana foram utilizadas módulos tubulares de membranas de polisulfona de 0,2 μm modelo CFP-2-E-8A com 3600 cm^2 de área, e membrana de polisulfona de 0,1 μm modelo CFP-1-E-55A com 2,1 m^2 de área, da Amersham Biosciences, com máxima pressão de operação de 185 kPa.

3.1.5. Membranas de ultrafiltração

Durante a execução do presente trabalho, cinco módulos tubulares de membranas de ultrafiltração foram empregadas:

- a) membrana de 50 kDa modelo UFP-50-E-55 com 110 cm^2 de área;

- c) membrana de 30 kDa modelo UFP-30-E-55 com 2,1 m² de área;
- a) membranas de 3 kDa modelo UFP-3-E-55 e UFP-3-E-3MA com 2,1 m² e 110 cm² de área, respectivamente;
- d) membrana de 1 kDa modelo UFP-1-C-9 com 1200 cm² de área.

Todas são de polisulfona da Amersham Biosciences, com máxima pressão transmembrana de operação de 185 kPa.

O *design* do módulo de filtração tangencial utilizado nos experimentos está representado na Figura 3.1.

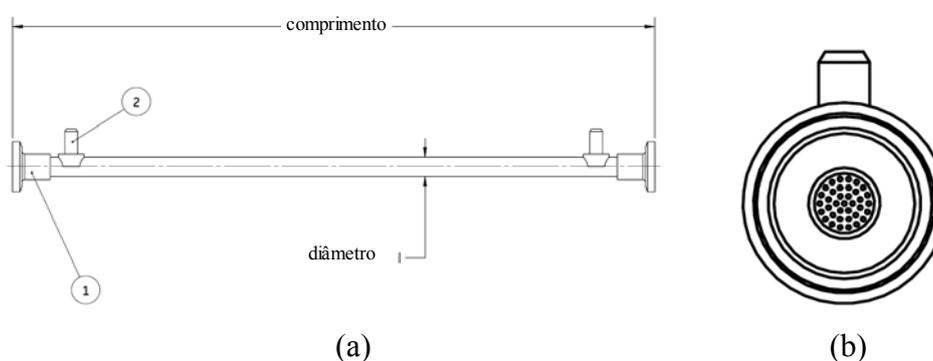


Figura 3.1. Representação esquemática do módulo de filtração tangencial utilizado para filtração: a) Cartucho: (1) entrada; (2) saída do filtrado; b) Disposição dos tubos na entrada. Figura adaptada da GE HEALTHCARE (2010).

3.2. Equipamentos

3.2.1. Colunas de adsorção

Nos experimentos de adsorção por troca-iônica foram utilizadas colunas de vidro de leito fixo da Pharmacia Biotech modelo C 1,0/50 (1,0 x 50 cm) e coluna modelo XK 16 16/40 (1,6 x 40 cm).

3.2.2. Tanques de mistura

Um frasco de vidro de 200 mL provido de agitação mecânica e controle de temperatura através de um banho termostatizado. Foi utilizado nos estudos cinéticos de adsorção e dessorção em tanque agitado.

3.2.3. Cromatógrafo

A concentração de AC e contaminantes foram determinadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), utilizando cromatógrafo com detector de arranjo de fotodiodo (Waters 996 com PDA) e injetor 717 automático e bomba série W510, pré-coluna e coluna C-18, μ -Bondapak de 3,9x300 mm.

3.2.4. Espectrofotômetro

Para determinação da concentração de fosfato e PEG foi utilizado um espectrofotômetro digital UV/Visible Pharmacia Biotech Ultrospec 2100 pro.

3.2.5. Banho termostatizado

Para os experimentos em colunas de adsorção, tanque agitado e filtrações utilizaram-se banho termostatizado da marca Nova Ética para manter a temperatura constante dos experimentos de microfiltração, ultrafiltração e adsorção.

3.2.6. Centrífuga refrigerada

Centrífuga refrigerada de bancada da marca Eppendorf Centrifuge 5403, com capacidade de seis tubos de centrifuga foi utilizada para os experimentos de otimização.

3.2.7. pHmetro

Um pHmetro da marca Qalxtron modelo 8010 foi utilizado para medir o pH das frações coletadas da coluna de leito fixo e variação do pH durante os estudos cinéticos de adsorção e dessorção do AC em tanque agitado.

3.2.8. Reômetro

Na caracterização reológica dos fluidos foi utilizado um reômetro de cilíndrico concêntrico da Brookfield Dial Reading, modelo LV DV-III (Brookfield Engineering Laboratories, Inc., Stoughton, Massachusetts, USA).

3.2.9. Ultrafreezer

Para conservação do caldo microfiltrado e ultrafiltrado foram utilizados um ultrafreezer da marca Forma Scientific com temperatura de -77°C .

3.2.10. Câmara de incubação rotatória

Foi utilizada nas etapas de determinação de isoterma e no modo estático para cinética degradação do AC a câmara de incubação marca Superohm.

3.3. Métodos analíticos

3.3.1. Determinação da concentração de PEG em soluções

A concentração do PEG nas amostras foi determinada de acordo com método desenvolvido por SKOOG (1979). Em um tubo de ensaio, para cada 1,0 mL da amostra a ser analisada previamente diluída foram adicionados 5,0 mL de ácido perclórico 0,5 M. A mistura resultante foi levada ao agitador de vórtice a fim de homogeneizar o sistema.

Para cada 4,0 mL da solução resultante, adicionaram-se 1,0 mL de solução de cloreto de bário 5% (m/m) e 0,5 mL de solução de iodo 0,1 (o soluto é composto de 73,85% de iodeto de potássio e 26,15% de iodo). O sistema resultante foi devidamente agitado no agitador de vórtice e, após 15 minutos, leu-se a absorbância a 535 nm em espectrofotômetro. A validade do método está restrita ao intervalo de 0 a 20 μM . A Figura 3.2 mostra o esquema da reação do PEG com cloreto de bário e iodeto:

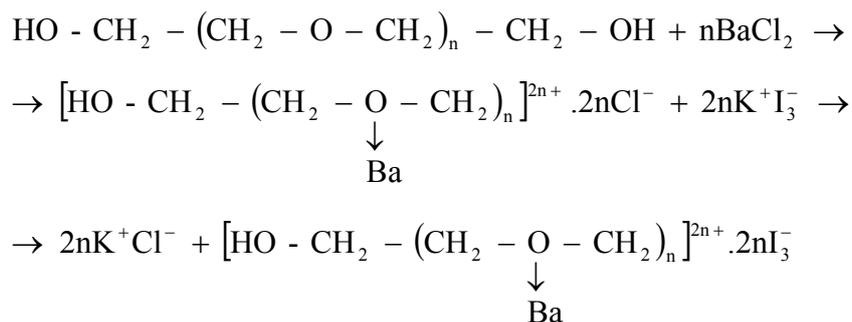


Figura 3.2. Formação do complexo de bário e íons de iodeto com polietileno glicol na proporção 1:1 (SKOOG, 1979).

Na primeira etapa, os complexos oxônicos solúveis entre íons de bário e dos polímeros são formados. Os complexos torna-se insolúveis com adição da solução de iodo-iodeto solução. A Figura 3.3 mostra a variação da absorvância em função da concentração de PEG.

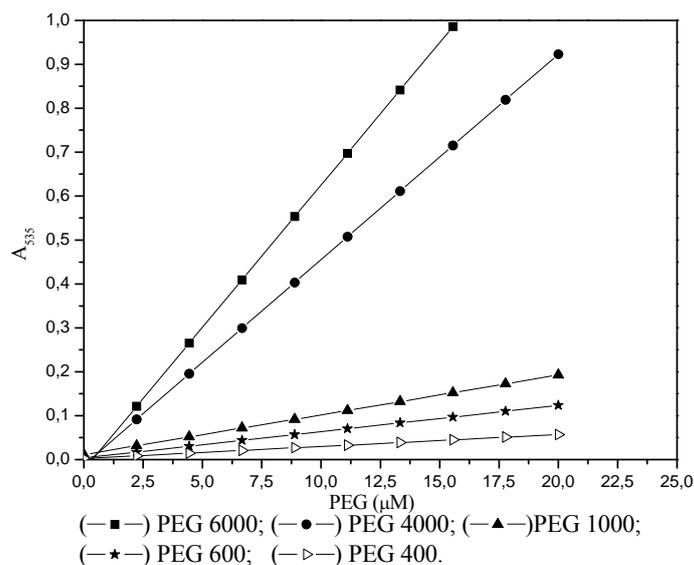


Figura 3.3. Curvas de calibração para os PEGs: 6000, 4000, 1000, 600 e 400.

Tabela 3.2. Regressão linear das curvas de calibração para os PEGs.

Tipo do PEG	Curva de calibração
6000	$A_{535} = 0,06485 \cdot C_{\text{PEG}} - 0,02296$
4000	$A_{535} = 0,04680 \cdot C_{\text{PEG}} - 0,01267$
1000	$A_{535} = 0,00907 \cdot C_{\text{PEG}} + 0,01111$
600	$A_{535} = 0,00598 \cdot C_{\text{PEG}} + 0,00373$
400	$A_{535} = 0,00272 \cdot C_{\text{PEG}} + 0,00257$

No intuito de verificar a aplicabilidade do método, foram realizados testes comparativos de absorvância em água pura e caldo de ácido clavulânico microfiltrado em membrana de 0,2 μm , ambos com concentrações conhecidas de PEG. Os resultados obtidos a partir do teste estão resumidos na Tabela 3.3.

Tabela 3.3. Verificação do método de SKOOG (1979) para soluções de PEG em caldos microfiltrados.

Espécie	Absorvância (535 nm)	Concentração (g/l)
Água + PEG-6000	0,428	0,041
Caldo + PEG-6000	0,453	0,044
Água + PEG-4000	0,493	0,044
Caldo + PEG-4000	0,514	0,045
Água + PEG-1000	0,309	0,030
Caldo + PEG-1000	0,336	0,033
Água + PEG-600	0,241	0,024
Caldo + PEG-600	0,243	0,024

As informações da Tabela 3.3 permitiram observar que o método é aplicável também a soluções de PEG em caldos microfiltrados. Para caldos ultrafiltrados não é diferente, já que estes estão bem mais puros do que aqueles.

3.3.2. Determinação da concentração de fósforo em soluções

Para determinação do fósforo em soluções foi utilizado o método azul de molibdato.

Primeiramente uma curva de calibração foi levantada de acordo com a massa total de fósforo no sistema. Em balões volumétricos de 100 mL, adicionou-se 0,5; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 de solução de fósforo padrão 10 mg.L^{-1} , completando o volume com água deionizada. O “branco” foi feito apenas com água destilada. Então, uma alíquota de 1 mL de cada solução foi adicionada num frasco Erlenmeyer de 100 mL. Adicionaram-se 2 mL de solução 0,15% (m/m) de sulfato de hidrazina, 5 mL de solução de molibdato de amônio e 50 mL de água deionizada em cada frasco Erlenmeyer. Em seguida, os Erlenmeyers foram levados em um banho termostatizado a 90°C durante 10 min, utilizando rolhas furadas. Feito isso, utilizou-se um banho de gelo para resfriamento. Os conteúdos dos Erlenmeyers foram transferidos na íntegra em balões de 100 mL,

completando o volume com água deionizada. A absorvância foi lida a 830 nm em espectrofotômetro (VOGEL, 1989).

3.3.3. Determinação da concentração de ácido clavulânico

a) CLAE: A concentração de ácido clavulânico foi determinada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) segundo o método descrito por FOULSTONE; READING (1982) com reação com imidazol, em um cromatógrafo com detector de arranjo fotodiodo (Waters 996 com PDA) utilizando uma coluna de fase reversa (C-18, μ -Bondapak, de 3,9 x 300 mm) e o equipamento foi operado dentro das seguintes condições: vazão 2,5 mL.min⁻¹, temperatura 28° C e o pico detectado no espectro de 311 nm. Os resultados foram obtidos utilizando-se uma curva de calibração construída a partir de um padrão de ácido clavulânico, a soluções na forma de clavunalato de potássio, obtidas através do produto farmacêutico Clavulin[®] (um comprimido contém 125 mg de clavunalato de potássio e 500 mg de amoxicilina), importado por *GlaxoSmithKline* Brasil Ltda, Rio de Janeiro. A fase móvel era composta de KH₂PO₄ (0,1 M) e metanol (6%) em pH 3,2 ajustado com ácido fosfórico. A Figura 3.4 mostra o esquema da reação do ácido clavulânico com imidazol.

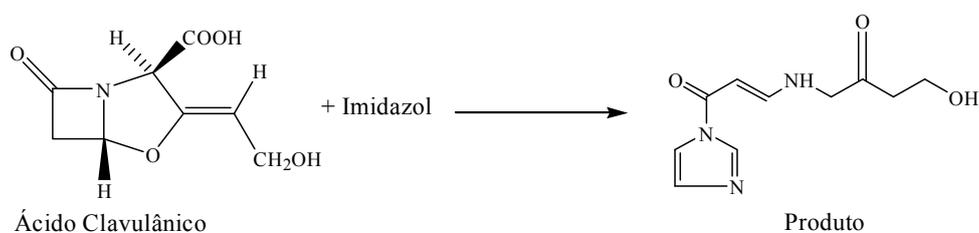


Figura 3.4. Reação do ácido clavulânico com imidazol (ERCKES *et al.* 1996).

b) Espectrofotometria: Nos estudos da hidrólise do AC nas fases de topo e fundo do SDFA a quantificação foi realizada através da reação com solução de imidazol 60 g/L e pH 6,8, segundo o método descrito por BIRD; BELLIS; GASSON (1982). O esquema da Figura 3.5 mostra os passos realizados para quantificação do AC tanto em CLAE quanto no espectrofotômetro.

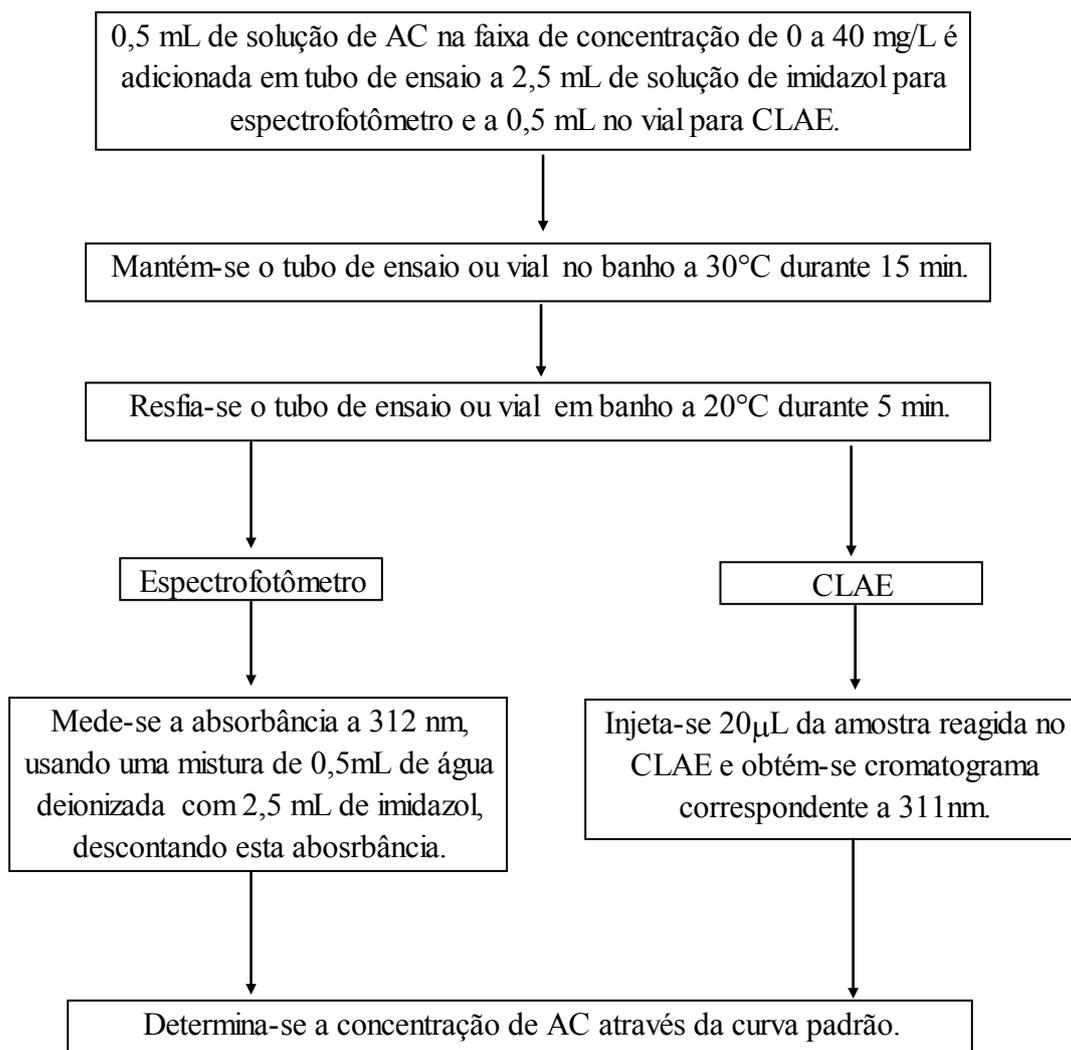


Figura 3.5. Esquema de quantificação de AC pelo método de reação de imidazol.

3.3.4. Análises dos contaminantes

Os contaminantes foram analisados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), em um cromatógrafo com detector de arranjo fotodiodo (Waters 996 com PDA) utilizando uma coluna de fase reversa (C-18, µ-Bondapak, de 3,9 x 300 mm) e o equipamento foi operado dentro das seguintes condições: vazão 2,5 mL.min⁻¹, temperatura 28° C e os picos detectados no espectro de 280 nm. Os contaminantes foram analisados no comprimento de onda de 280 nm, pois as maiores das proteínas apresentam a presença de tirosina, triptofano e fenilalanina, que são aminoácidos

aromáticos, com anel de benzeno presente em sua estrutura e, portanto, com duplas ligações conjugadas as quais apresentam absorção a 280 nm.

3.4. Procedimento experimental

3.4.1 Unidade e operação da filtração

Tanto nos ensaios da resistência da membrana, quanto nos ensaios da ultrafiltração do sistema PEG/AC, o aparato experimental foi estruturado tal como a representação esquemática apresentada na Figura 3.6.

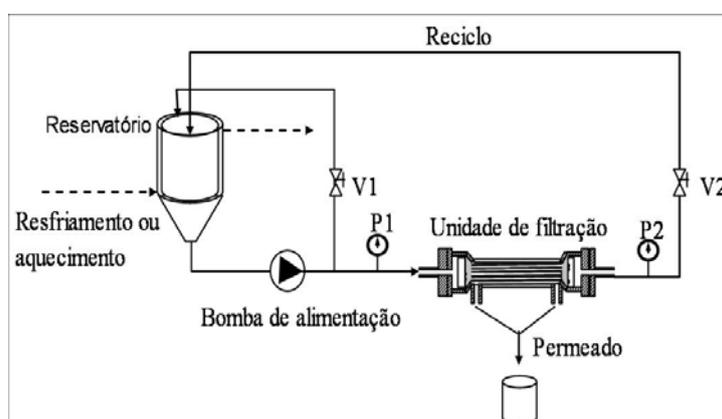


Figura 3.6. Aparato experimental utilizado nos ensaios de microfiltração e ultrafiltração. V1 - válvula para regulagem da vazão. V2 - Válvula de segurança (ou alívio) do fabricante Mipel. P1, P2 - Manômetros do tipo Bourdon.

O sistema de filtração tangencial foi composto por um frasco de alimentação cujo equilíbrio térmico de trabalho foi mantido constante com auxílio de um banho termostatizado. As soluções foram bombeadas para módulo de filtração com o auxílio de uma bomba peristáltica modelo Ismatec. A pressão transmembrana foi adequadamente ajustada por uma válvula de controle, tipo agulha-Mipel (válvula V1 e V2). As pressões a montante e a jusante do módulo foram monitoradas através de manômetros tipo Bourdon preenchidos com glicerina. O concentrado era reciclado para reservatório e o permeado era coletado em uma proveta, sendo registrado o valor do volume de permeado (V_p) em cada instante de tempo.

3.4.2. Limpeza da membrana

Após cada experimento foi realizada a limpeza das membranas de MF e UF. Este procedimento era constituído de três estágios:

- 1) Limpeza da membrana com água deionizada.
- 2) Recirculação de uma solução de 0,2 M de NaOH a 50° C por 60 minutos a 98 kPa de pressão transmembrana.
- 3) Recirculação de uma solução de 4% de NaClO a 20° C por 60 minutos a 98 kPa de pressão transmembrana
- 4) Limpeza da membrana com água deionizada até obter um o pH neutro do permeado. Após limpeza o fluxo de água destilada era medido. Este protocolo de limpeza era realizado a fim de restabelecer a permeabilidade hidráulica da membrana utilizada nos experimentos.

3.4.3. Etapa de extração do AC no sistema de duas fases aquosas PEG/fosfato

A preparação do sistema bifásico aquoso foi dividido em 2 duas etapas, numa primeira etapa baseados nas melhores condições determinadas por HIRATA (2003), sendo estes sistemas utilizados para os ensaios de re-extração do AC da fase rica de PEG por ultrafiltração e troca-iônica. Nos ensaios de re-extração por ultrafiltração foram utilizados caldos pré-tratados na membrana de microfiltração de 0,2 μm . No entanto, para re-extração por troca iônica foram utilizados caldos pré-tratados por membranas de ultrafiltração de 3 kDa.

Os sistemas de duas fases aquosas foram preparados a partir das soluções em estoque PEG 6000, 4000, 1000 (50% p/p) e 600, 400 (100% p/p) e solução tampão de fosfato de potássio pH 6,2 (30% m/m) juntamente com caldo de AC pré-tratado foi misturado nas composições pré-estabelecidas por um *mixers* por 50 s, o sistema foi posto em repouso por 20 min em um funil de separação (Figura 3.7). Amostras de cada uma das fases foram coletadas para análise. Todos os experimentos dessa categoria foram realizados a $20 \pm 2^\circ \text{C}$.

Na segunda etapa foram realizados ensaios para obter as melhores condições de separação, rendimento e purificação do AC para SDFA. Foram preparados sistemas PEG/fosfato misturando frações apropriadas de solução estoque de PEG e concentrado de fosfato de potássio (30% m/m) com pH requerido, com 1 mL do caldo ultrafiltrado

em tubo graduado de 15 mL. No final o peso é ajustado para 10 g com água deionizada. O pH da solução de fosfato de potássio foi ajustado pela mistura de frações adequadas de fosfato potássio monobásico e dibásico. PEG 6000, 4000 e 1000 foram usados em solução estoque 50% (m/m), já o PEG 400 e 600 é usado diretamente 100% (m/m), pois são comercialmente líquidos. Os componentes são adicionados na seguinte ordem: fosfato, PEG, caldo e água (Figura 3.8). Depois era misturado em vórtice por 50s a duas fases são separadas por centrifugação por 1 min e 1800 rpm em centrífuga de bancada. Após a leitura do volume das fases amostras foram retiradas para análise do AC e contaminantes.

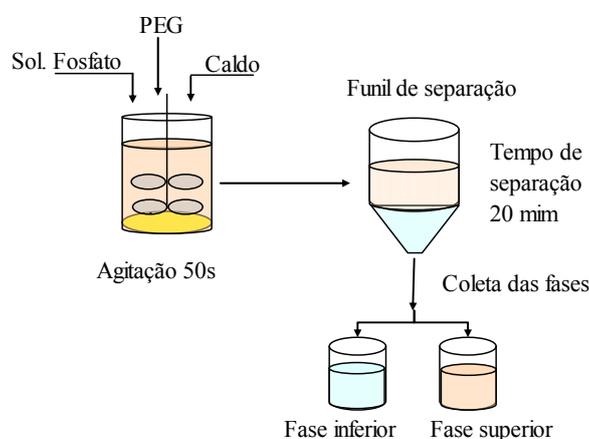


Figura 3.7. Esquema dos experimentos para SDFA na primeira etapa.

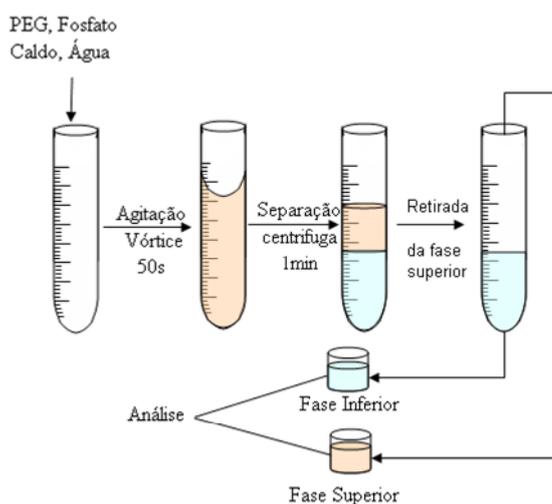


Figura 3.8. Esquema da rotina experimental para sistema de 10 g de massa total.

3.4.4. Obtenção dos intervalos experimentais para a otimização

Para análise da influência das variáveis da massa molar do PEG (mPEG), pH, temperatura, linha de amarração (*tie-line length*, TLL) e razão entre volumes das fase (rTLL) foram realizados experimentos com sistema de 10 g descrito no item 3.4.3 conforme o planejamento fatorial 2^5 com 3 repetições no ponto central. A Tabela 3.4 apresenta as faixas estudadas para as cinco variáveis do delineamento experimental.

Para análise estatística foram utilizadas duas variáveis-respostas: coeficiente de partição e rendimento do AC.

Na segunda etapa, foi realizado um delineamento composto central rotacional (DCCR) 2^4 com 8 pontos axiais e 3 pontos centrais resultando em 27 experimentos (Tabela 3.5). Para análise estatística foram utilizadas três variáveis respostas: coeficiente de partição, rendimento e fator de purificação. O *software Statistica* (versão 5.0) foi usado em ambas as etapas para obter os efeitos dos parâmetros, regressão e análises gráficas dos dados obtidos.

Tabela 3.4. Fatores e níveis de valores que foram utilizados no planejamento fatorial 2^5 .

Variáveis	Códigos	Níveis		
		-1	0	+1
mPEG	<i>A</i>	600	1000	4000
pH	<i>B</i>	6,5	7	7,5
Temp.(° C)	<i>C</i>	20	25	30
rTLL	<i>D</i>	0,75	1	1,25
TLL	<i>E</i>	37	43	49

Tabela 3.5. Códigos e valores das variáveis utilizados no delineamento composto central rotacional (DCCR) 2^4 .

Variáveis	Níveis				
	-2	-1	0	1	2
mPEG	400	600	1000	4000	6000
pH	5,8	6,4	6,9	7,5	8,0
rTLL	0,4	0,7	1,0	1,3	1,6
TLL	30,0	36,0	42,0	48,0	54,0

3.4.5. Determinação das linhas de amarração e razão de volume de fase

As curvas binodais e linhas de amarração (*tie-line*) do sistema composto por PEG e fosfato são determinadas de acordo com método descrito por ALBERTSSON (1986). As linhas de amarração são calculadas usando a equação 3.1:

$$TLL = \sqrt{(P_t - P_f)^2 - (F_t - F_f)^2} \quad (3.1)$$

onde P_t é concentração de PEG na fase de topo; P_f é concentração de PEG na fase de fundo; F_t é concentração do sal fosfato na fase de topo; e F_f é concentração do sal fosfato na fase de fundo.

A razão de volume de fase, ou razão entre as *tie-line*, (rTLL) é determinada através de uma *tie-line* de fase de topo de composição T e de fase de fundo de composição F e um ponto M representante de um sistema de duas fases desta mesma *tie-line* \overline{TF} (Figura 3.9). As razões de volumes das fases são calculadas conforme a Equação 3.2 (MISTRY, 1996).

$$rTLL = \frac{V_T \rho_T}{V_F \rho_F} = \frac{\overline{MF}}{\overline{MT}} \quad (3.2)$$

onde V e ρ são volumes e densidades das fases, respectivamente. Sendo \overline{MF} e \overline{MT} são segmentos que liga o ponto M ao ponto de composição da fase de fundo e da fase de topo.

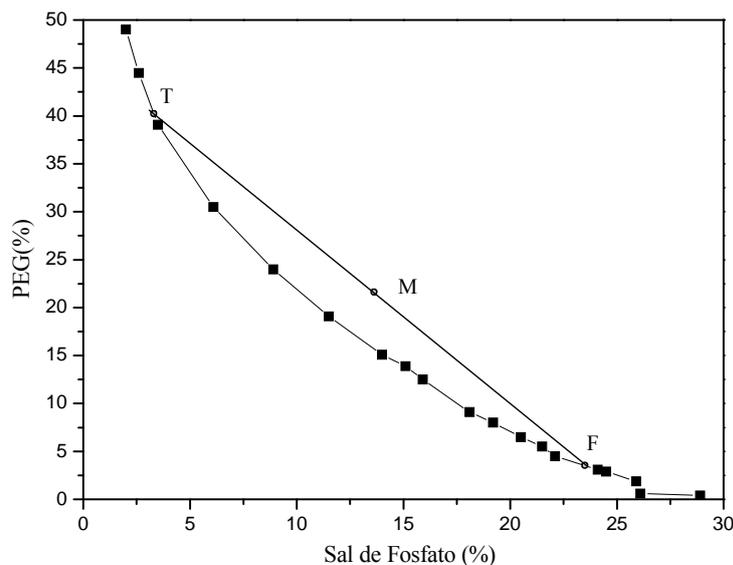


Figura 3.9. Típico diagrama de fase. Figura adaptada de ALBERTSSON (1986).

3.4.6. Etapa de re-extração do ácido clavulânico da fase de topo do SDFA por ultrafiltração sem precipitação de sais

A fase de topo do SDFA foi separada para filtração esta que consiste em purificar o AC através da retenção de proteínas. Mas o principal foco de estudo nesta etapa foi a retenção de PEG na membrana de ultrafiltração e o cálculo de parâmetros do processo, como resistividade da camada de gel, fator de concentração e rejeição do PEG e fosfato.

O aparato experimental é idêntico ao exibido na Figura 3.5. A fase topo foi colocada no reservatório e mantida a temperatura de 10° C. Foram coletados dados de volume de permeado em função do tempo de operação. Amostras de retido e permeado foram coletadas para análise de PEG, fósforo e AC.

3.4.7. Etapa de re-extração do ácido clavulânico da fase de topo do SDFA por ultrafiltração com precipitação de sais

Após a retirada de uma porção da fase de topo do SDFA, foram feitos estudos preliminares sobre adição de álcool etílico, a qual foi determinada adição de etanol numa proporção volumétrica de 1,8:1 (v/v) de topo, sendo esta a melhor relação para que sejam retirados alguns sais que influenciam no processo de ultrafiltração. Então, após a adição de álcool etílico, o sistema foi posto em repouso por 7 min em um frasco Erlenmeyer para que os sais precipitassem. Após a separação do sobrenadante foi feita re-extração do AC da fase de topo por ultrafiltração conforme descrito no Item 3.4.6.

3.4.8. Purificação/extração do ácido clavulânico provindo das etapas de filtração e SDFA em coluna de leito fixo

A extração do AC foi realizada em um processo de adsorção por troca iônica, utilizando-se colunas de leito fixo. O sistema foi conduzido em dois modos diferentes de operação:

1º Modo: As soluções contendo AC, água e eluente (solução de NaCl) foram alimentadas à coluna a vazão constante com auxílio de uma bomba peristáltica. A eluição foi realizada de forma linear ou de degraus do eluente. Aliquotas de 5, 10 e 20

mL foram coletadas após passarem pela coluna e as concentrações de ácido clavulânico, PEG e fosfato foram determinados. A temperatura da coluna foi mantida com o auxílio de um banho termostaticado a ela acoplado. O aparato experimental está esquematizado na Figura 3.10.

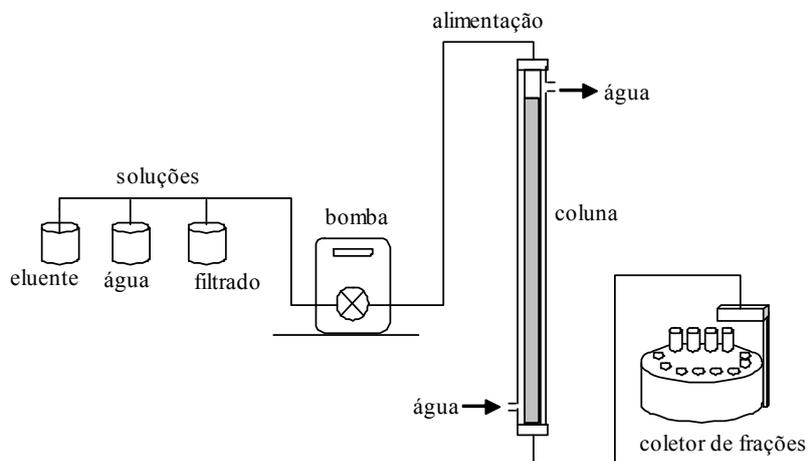


Figura 3.10. Esquema do aparato experimental utilizado nas trocas iônicas.

2º Modo: O equilíbrio térmico na coluna foi atingido com o auxílio de um banho termostaticado a ela acoplado. Na primeira etapa, foi feito passar 100 mL de caldo previamente tratado, conforme descrito no item 3.4.1. Após a injeção do caldo, a coluna foi lavada com 90 mL água deionizada. Na segunda etapa a válvula V1 é aberta e a eluição foi realizada com um gradiente linear do eluente, que ocorre na forma de vasos comunicantes como se pode observar na Figura 3.11. Foram coletadas alíquotas do efluente da coluna sendo as concentrações de ácido clavulânico e os contaminantes determinados conforme descrito anteriormente.

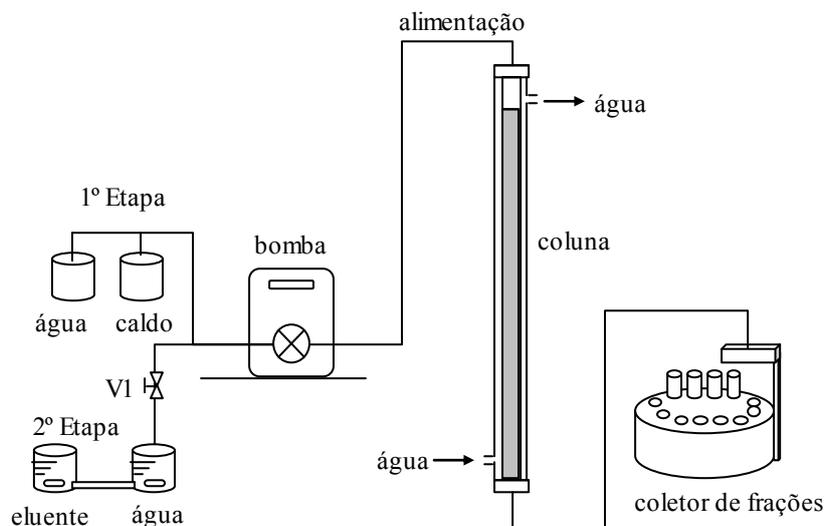


Figura 3.11. Esquema do aparato experimental utilizado para troca iônica e eluição com gradiente linear.

3.4.9. Modelo matemático do processo de eluição por gradiente

A determinação do modelo matemático que descreve o gradiente de eluição por vasos comunicantes está descrito na sequência:

Considerando dois tanques de diâmetros D_1 e D_2 , contendo volumes iniciais V_{A0} e V_{B0} , sendo F_1 a vazão de saída e F_2 a vazão entrada no tanque 1, ambos os tanques perfeitamente homogeneizados por agitadores magnéticos (Figura 3.12).

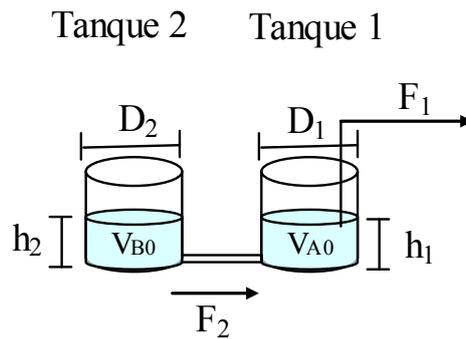


Figura 3.12. Esquema do processo para a produção de gradientes lineares, côncavos e convexas para modelagem matemática.

Considerando a lei dos vasos comunicantes temos:

$$h_1 = h_2, \quad (3.3)$$

onde h_1 e h_2 alturas, logo:

$$\frac{dh_1}{dt} = \frac{dh_2}{dt} \quad (3.4)$$

A variação do volume com tempo nos tanques:

tanque 1:

$$V_1(t) = V_{A0} + F_2 t - F_1 t \quad (3.5)$$

tanque 2:

$$V_2(t) = V_{B0} - F_2 t \quad (3.6)$$

Balço de massa para o eluente no tanque 1:

$$\frac{dV_1 \cdot C_1}{dt} = F_2 \cdot C_2 - F_1 \cdot C_1 \quad (3.7)$$

Utilizando a equação 3.5 e 3.7 e supondo $F_1 = F_2$ temos:

$$\frac{V_1}{F_2} \cdot \frac{dC_1}{dt} = C_2 - C_1 \quad (3.8)$$

Rearranjando a equação 3.8 em função dos diâmetros dos tanques temos:

$$\left(\frac{V_{A0}}{F_1} \cdot \left[1 - \frac{D_1^2}{D_2^2} \right] - \frac{D_1^2}{D_2^2} \cdot t \right) \cdot \frac{dC_1}{dt} = C_2 - C_1 \quad (3.9)$$

condição de contorno:

$$C_1(0) = 0 \quad (3.10)$$

Resolvendo a equação diferencial 3.9 temos:

$$C_1(t) = C_2 - \left(\frac{\left(-V_{A0} \cdot D_2^2 - V_{A0} \cdot D_1^2 + D_1^2 \cdot t \cdot F_1 \right) \left(\frac{D_2}{D_1} \right)^2}{\left(-V_{A0} \cdot D_2^2 - V_{A0} \cdot D_1^2 \right) \left(\frac{D_2}{D_1} \right)^2} \cdot C_2 \right) \quad (3.11)$$

onde o C_2 é a concentração inicial do eluente no tanque 2 e a C_1 variação da concentração no tanque 1

A Figura 3.13 mostra o esquema de três aparelhos para produzir gradientes lineares, côncavos e convexos para cromatografia de baixa pressão utilizando a Equação 3.11.

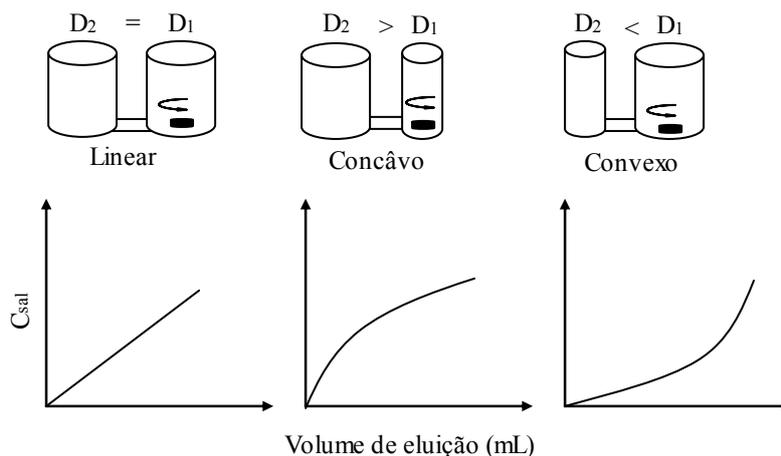


Figura 3.13. Esquemas de aparelhos simples para a produção de gradientes lineares, côncavos e convexos. No reservatório D_1 dos aparelhos, temos a presença de agitador para homogeneização da mistura de dois tampões de diferentes forças iônicas diferentes (SPADARO, 2007a).

3.4.10. Estudos cinéticos de adsorção em tanque agitado

Os estudos cinéticos de adsorção e dessorção em tanque agitado foram feitos conforme o método descrito por BARBOZA; ALMEIDA; HOKKA (2002a). A um tanque de vidro de 200 mL provido de agitação mecânica e controle de temperatura através de um banho termostático foi adicionado 50 g de resina em base úmida e 100 mL de fase topo do SDFa contendo AC. Foram retiradas alíquotas em intervalos de tempo definidos durante a adsorção e a eluição. Após adsorção a resina foi lavada com água deionizada antes da eluição do AC com solução de NaCl. Para resina Streamline QXL após lavagem da resina com água deionizada foram utilizados 100 mL da solução de NaCl de 1% (m/v) e para resina Amberlite IRA-400Cl utilizou-se da solução de NaCl de 5% (m/v). A concentração de AC foi analisada conforme descrito em métodos de análise de AC.

3.4.11. Determinação das isotermas

As isotermas foram obtidas através de ensaios em batelada em mesa incubadora rotativa. Para 5 mL de solução da fase de topo do SDFa contendo AC,

preparado conforme descrito no item (3.4.3), diluídos em diferentes concentrações com água deionizada, foram adicionadas 5 g de resina adsorvente (base úmida). Os frascos contendo resina e solução de AC foram agitados a 200 rpm. Após atingir o equilíbrio (1 h), os valores das concentrações finais de AC foram analisados por cromatografia, obtendo-se as isotermas de equilíbrio.

3.4.12. Tratamento das resinas

Para os experimentos de adsorção foram utilizados dois tipos de resina de troca iônica Amberlite IRA 400-Cl e Streamline Q XL, ambas as resinas foram tratadas de acordo com recomendado pelos fabricantes:

a) Resina Amberlite IRA 400-Cl:

A resina Amberlite IRA 400-Cl pode ser regenerada tanto com solução de NaCl (ciclo do cloreto) como com solução de NaOH. Quando esta resina é regenerada com solução de NaCl, é possível remover ânions mais seletivos tais como SO_4^{2-} , NO_3^- , PO_4^{3-} capazes de deslocar os íons cloreto da resina. Quando se pretende remover ânions menos seletivos deve trabalhar com ciclo da hidroxila, pois todos os ânions da solução são removidos desde que a solução esteja em pH ácido. Estudos prévios realizados por ALMEIDA (2003) demonstraram que o ciclo do cloreto apresentou melhor resultado para adsorção do ácido clavulânico na resina Amberlite IRA 400-Cl.

Para o ciclo dos íons cloreto a resina Amberlite IRA 400-Cl é regenerada com 10% (m/v) de solução NaCl por cerca de 1 hora e seguida a resina é lavada com água deionizada para retirada do excesso de NaCl. Para coluna de leito fixo o fluxo da solução de NaCl foi de $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$.

b) Resina Streamline Q XL:

A resina Streamline Q XL é regenerada com uma seqüência de soluções que remove adsorventes fortemente ligados à resina. O protocolo de regeneração segue:

1º - Solução 0,5 M de NaOH + solução 1,0 M de NaCl na velocidade de $30 \text{ cm} \cdot \text{h}^{-1}$ por 4 h;

2º - 4 volumes do leito da coluna de água deionizada na velocidade $100 \text{ cm} \cdot \text{h}^{-1}$;

3° - 4 volumes do leito da coluna de solução de ácido acético 25% na velocidade 100 cm.h⁻¹;

4° - 10 volumes do leito da coluna de água deionizada na velocidade de 100 cm.h⁻¹.

Dependo da natureza do contaminantes, diferentes protocolos podem ser usados em combinação para regeneração da resina (AMERSHAM BIOSCIENCES).

3.4.13. Estudo da cinética de degradação

O procedimento experimental do estudo da cinética da degradação do AC na presença do PEG foi baseado no estudo realizado por BERSANETTI *et al.* (2005). Após a separação das fases do SDFA, cujo procedimento experimental está descrito na primeira etapa (Item 3.4.3), um volume de cada fase do SDFA foi recolhido em frasco Erlenmeyer de 250 mL e mantido à temperatura constante de 20° C. A determinação da concentração do AC foi feita retirando-se periodicamente alíquotas de 0,5 mL das soluções estocadas no ambiente com a temperatura controlada.

3.4.14. Estudo do sistema contínuo de SDFA

Os experimentos contínuos foram baseados nos trabalhos realizados por KAUL *et al.* (1995) e MISTRY *et al.* (1996).

Para a realização destes experimentos utilizou-se um tanque de mistura, sob constante agitação de 200 rpm. Este foi alimentado por correntes de PEG, solução de sal de fosfato (30% m/m) e solução de AC (caldo pré-tratado ou solução de Clavulin[®]) com o auxílio de bombas peristálticas. Em seguida, a mistura foi bombeada continuamente para um sedimentador vertical, onde ocorria à separação das fases e continuamente estas fases eram retiradas. Foram coletadas amostras das fases de topo e fundo a cada 5 minutos durante um período de 40 minutos. Na Figura 3.14 pode se observar o esquema experimental.

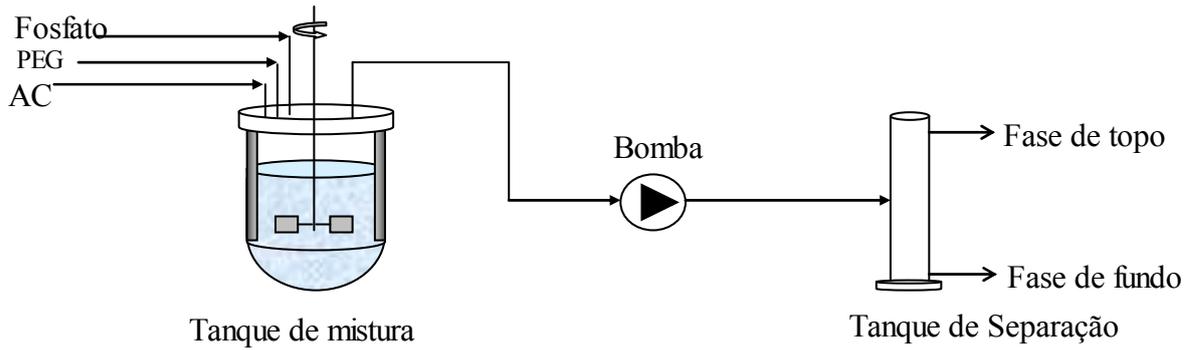


Figura 3.14. Esquema do processo contínuo para extração do AC.

3.5. Metodologia de análise de resultados

3.5.1. Determinação do coeficiente de distribuição, rendimento e fator de purificação

O coeficiente de distribuição do AC (K) é razão entre a concentração de AC na fase de topo (C_{ACtopo}) e de fundo ($C_{ACfundo}$).

$$K = \frac{C_{ACtopo}}{C_{ACfundo}} \quad (3.12)$$

O fator de purificação foi definido de acordo com a seguir:

$$FP = \frac{C_{AC} C_{Cotopo}}{C_{ACamostra} C_{Co}} \quad (3.13)$$

onde C_{Co} é concentração de contaminantes na amostra inicial; C_{Cotopo} é concentração de contaminantes na fase de topo.

O rendimento foi determinado de acordo com a abaixo:

$$R(\%) = \frac{C_{ACtopo} V_{topo}}{C_{AC} V_{amostra}} \times 100 \quad (3.14)$$

onde V_{topo} é volume da fase de topo, $V_{amostra}$ é volume da amostra inicial contendo AC adicionado no sistema de duas fases aquosas.

A degradação foi determinada de acordo com a abaixo

$$D(\%) = 1 - R(\%) \quad (3.15)$$

3.5.2. Determinação de fluxo no estado pseudo-estacionário, J_p , e resistividade do gel, I .

O fluxo tangencial de permeação de uma membrana (J_p) de microfiltração e ultrafiltração usualmente é escrito em termos da diferença de pressão transmembrana (ΔP) e da resistência total (R_T).

$$J_p = \frac{1}{A_m} \frac{dV_p}{dt} = \frac{\Delta P}{\mu \cdot R_T} \quad (3.16)$$

onde μ é a viscosidade da solução e ΔP é a pressão transmembrana (P_{TM}).

Neste estudo a resistência total (R_T) é definida como:

$$R_T = R_m + R_c \quad (3.17)$$

onde R_m é a resistências hidráulica intrínseca devido à membrana e R_c é a resistência da camada de gel (gel e sólidos) formada na superfície da membrana. A pressão transmembrana (P_{TM}), é dada pela equação a seguir:

$$P_{TM} = \frac{P_1 - P_2}{2} - P_p \quad (3.18)$$

onde P_1 e P_2 são as pressões de saída e entrada do cartucho de filtração e P_p é a pressão manométrica no permeado.

R_m é constante para um determinado filtro e R_c é uma função da resistência específica da camada de gel acumulada (α) na área superficial de filtração, A , o volume do permeado coletado (V_p) e da concentração de partículas por unidade de volume de permeado (C_b) como demonstra a equação a seguir:

$$R_c = \frac{V_p}{A} \times \alpha C_b = \frac{V_p}{A} \times I \quad (3.19)$$

Em muitos casos é impossível determinar C_b e α com exatidão. Por conveniência, a resistividade da camada de gel (I) é definida como αC_b . Substituindo R_c da Equação 3.19 na Equação 3.16 temos:

$$J_p = \frac{P_{TM}}{\mu_p \left(R_m + \frac{V_P}{A} I \right)} \quad (3.20)$$

Reescrevendo V/A como Jt e rearranjando temos a seguinte equação:

$$P_{TM} = J_p \mu_p R_m + J_p^2 \mu_p t \quad (3.21)$$

A resistividade da camada de gel (I) foi calculada em função do tempo (t) de acordo com a seguinte equação:

$$I = \frac{P_{TM} - J_p \mu_p R_m}{J_p^2 \mu_p t} \quad (3.22)$$

Devido à presença da camada de gel pode ser definido o coeficiente de rejeição como:

$$R = 1 - \frac{C_p}{C_0} \quad (3.23)$$

onde C_0 é concentração inicial do produto e C_p concentração no permeado.

De acordo com a Equação 3.22 pode-se considerar que a resistência da torta atinge um valor máximo, o que permite dizer que o fluxo de permeado atingirá um valor mínimo, no estado de pseudo-estacionário (J_{ps}). Quanto menor a influência das resistências no processo maior o valor de J_{ps} e conseqüentemente maior a produtividade.

Quando um solvente puro como a água é filtrada por uma membrana, o fluxo (J_p) é proporcional à pressão transmembrana (P_{TM}), a Equação 3.16 é escrita como:

$$J_p = \frac{P_{TM}}{\mu_p R_m} \quad (3.24)$$

onde R_m é a resistência hidráulica intrínseca da membrana, calculado com a determinação experimental de J_p .

3.5.3. Caracterização reológica dos fluidos

De modo geral, caldos como de cultivos de *Streptomyces clavuligerus*, apresentam característica de fluido não-Newtoniano, tipo pseudo-plástico cuja equação a seguir representa o comportamento reológico.

$$\tau = K_c \gamma^n \quad (3.25)$$

onde τ é a tensão de cisalhamento; K_c é o índice de consistência; γ é a taxa de deformação e n o índice de escoamento. Com a Equação 3.24 é possível prever a viscosidade aparente do fluido em seu regime de escoamento, tal como representado pela equação (3.25):

$$\eta_a = K_c \gamma^{n-1} \quad (3.26)$$

Para fluidos newtonianos o índice de escoamento é igual a 1 e a viscosidade (μ) é igual ao índice de consistência.

3.5.4. Análise do leito fixo

Uma vez definida as condições de operação em uma coluna de leito fixo, buscou-se avaliar o desempenho da adsorção em função do comportamento da curva de ruptura. A curva de ruptura é obtida através dos dados experimentais de $C/C_0(t)$.

A forma de uma curva de ruptura, usualmente depende da isoterma de adsorção, da vazão, da velocidade de transferência de massa externas às partículas e da difusão nos poros. A capacidade total ou estequiométrica do leito empacotado, se a coluna estiver em equilíbrio com alimentação, pode ser obtida através da área entre a curva e a linha onde C/C_0 igual a 1. Na situação ideal, na ausência de resistências externas à transferência de massa, a resposta da coluna seria um degrau posicionado em t igual a t_{st} (tempo estequiométrico) (Figura 3.15).

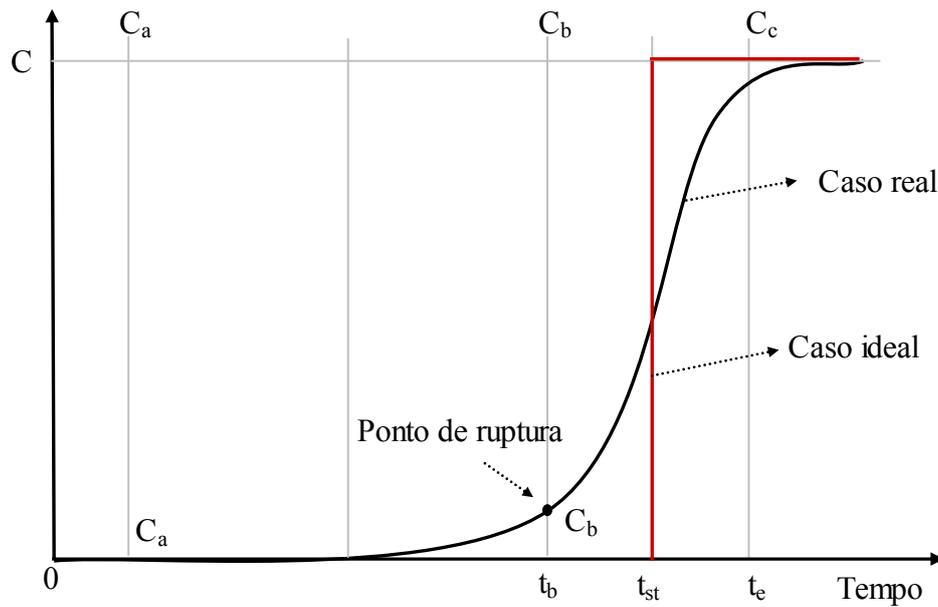


Figura 3.15. Curva típica de saturação de adsorventes em leito fixo (VERMEULEN; ANDERSON, 1993).

A capacidade total ou estequiométrica do leito pode ser obtida pela equação a seguir:

$$t_t = \int_0^\infty \left(1 - \frac{C}{C_0}\right) dt \tag{3.26}$$

onde t_t é o tempo equivalente a capacidade total ou estequiométrica. A capacidade utilizada do leito vai até o ponto de ruptura, no tempo t_b que pode ser considerado como aquele onde $C/C_0 = 0,1$. Esta capacidade pode ser calculada pela a equação que segue:

$$t_u = \int_0^{t_b} \left(1 - \frac{C}{C_0}\right) dt \tag{3.27}$$

onde t_u é o tempo equivalente a capacidade utilizada ou o tempo no qual o efluente atinge a máxima concentração permitida de soluto. O valor de t_u é geralmente muito próximo de t_b . A razão t_u/t_t é a fração da altura utilizada até o ponto de ruptura. Sendo H_t altura total do leito e H_b a altura utilizada do leito até o ponto de ruptura, tem-se:

$$H_b = \frac{t_u}{t_t} H_t \quad (3.28)$$

A altura não utilizada do leito é H_{unb} , é então a fração de tempo não utilizada da altura total é:

$$H_{unb} = \left(1 - \frac{t_u}{t_t}\right) H_t \quad (3.29)$$

O H_{unb} representa a zona de transferência de massa. Esta depende da velocidade do fluido e essencialmente independente do total da coluna. O valor de H_b é diretamente proporcional a t_b . Então a altura H_{unb} da zona de transferência de massa é simplesmente somada a altura H_b , tal como descrito a seguir:

$$H_t = H_{unb} + H_b \quad (3.30)$$

A partir dos valores de t_u , t_b e t_t , obtidos da área da curva de ruptura, é possível calcular a eficiência da utilização do leito (ϕ_1), a eficiência de recuperação de produto (ϕ_2) e a produtividade (P).

A eficiência da utilização do leito foi definida como:

$$\phi_1 = \frac{t_u}{t_t} \quad (3.31)$$

A eficiência de recuperação de produto foi definida como:

$$\phi_2 = \frac{t_u}{t_b} \quad (3.32)$$

A produtividade como:

$$P = \frac{t_t}{t_e} C_0 V_Z \quad (3.33)$$

onde V_Z é a vazão volumétrica da solução de soluto (McCABE; SMITH; HARRIOTT, 1993).

3.5.5. Modelagem do sistema contínuo de duas fases aquosas para estágio simples

Normalmente a extração contínua de um estágio utilizando o sistema de duas fases aquosas (SDFA) é composta de um tanque de mistura e um tanque de sedimentação como demonstrado no item 3.4.3 na Figura 3.12.

O modelo matemático utilizado para determinar as vazões de entradas no sistema contínuo foi baseado no trabalho desenvolvido por SIMON; GAUTAM (2004).

Os componentes básicos do sistema de duas fases aquosas são: polímero ($p1$), sal (outro polímero) ($p2$) e água ($p3$). A fase superior é rica em polímero (PEG), e a fase inferior rica em sal (sal fosfato de potássio) (Figura 3.16).

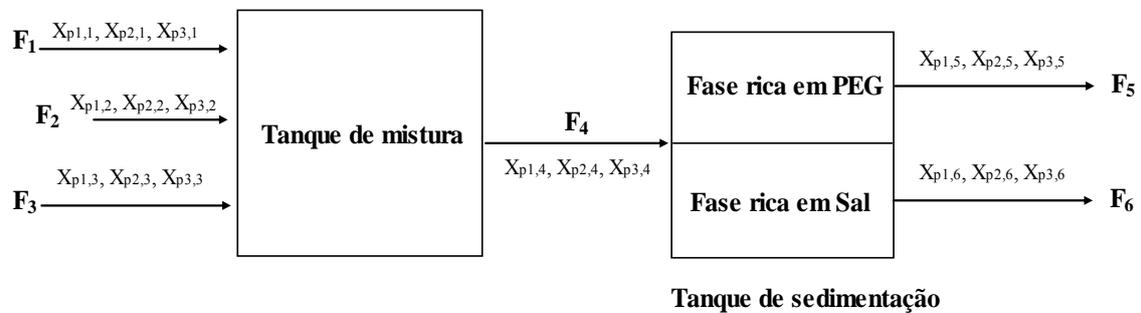


Figura 3.16. Esquema do fluxo da extração contínua de estágio simples do SDFA.

a) Balanço para o tanque de mistura:

Os balanços de massa para polímero, sal e água no tanque de mistura, considerando em regime estacionário do processo, para cada componente pode ser descrito como:

$$F_1 X_{p1,1} + F_2 X_{p1,2} + F_3 X_{p1,3} = F_4 X_{p1,4} \tag{3.34}$$

$$F_1 X_{p2,1} + F_2 X_{p2,2} + F_3 X_{p2,3} = F_4 X_{p2,4} \tag{3.35}$$

$$F_1 X_{p3,1} + F_2 X_{p3,2} + F_3 X_{p3,3} = F_4 X_{p3,4} \tag{3.36}$$

onde F_i e corrente de cada solução e $X_{i,j}$ representa a fração mássica do componente na corrente j .

b) Balanço de massa no tanque de separação:

A vazão de alimentação (F_4) é uma vazão bifásica heterogênea, que contém vários componentes. A composição global da vazão de alimentação é localizada sobre a curva binodal. Assume que o efeito da temperatura na densidade é desprezível, e as densidades da mistura heterogênea (ρ_A), fase superior (ρ_T) e fase inferior (ρ_B) são aproximadamente iguais: $\rho_A \approx \rho_T \approx \rho_B$. Na prática, as duas fases estão separadas no equipamento por gravidade conforme as concentrações de equilíbrio de fase dadas pelas linhas de amarração. Esta separação requer uma diferença de densidade entre fase superior e fase inferior ($\rho_B > \rho_T$), tal que $\rho_B > \rho_A > \rho_T$. Dentro da extensão da análise apresentada, é suficiente mencionar que as diferenças entre as densidades das fases não são significantes a ponto de influenciar as composições finais computadas dos componentes no sistema. Porém, esta diferença é suficiente para ocorrer a separação de fase no tanque de separação por gravidade. Assumindo o estado estacionário, o balanço de massa no tanque de separação para cada componente pode ser descrito da forma que segue:

$$F_4 X_{p1,4} = F_5 X_{p1,5} + F_6 X_{p1,6} \quad (3.37)$$

$$F_4 X_{p2,4} = F_5 X_{p2,5} + F_6 X_{p2,6} \quad (3.38)$$

$$F_4 X_{p3,4} = F_5 X_{p3,5} + F_6 X_{p3,6} \quad (3.39)$$

O coeficiente de partição do componente i (K_i) assume que é constante:

$$K_i = \frac{C_{i,T}}{C_{i,B}} \quad (3.40)$$

Na prática, o coeficiente de partição é uma função das composições do sistema, temperatura e pH. Assumindo que as perturbações nas concentrações do sistema são relativamente pequenas e que o sistema sempre está operando perto da mesma região da linha de amarração no diagrama de fase. Como resultado, as influências das perturbações da concentração nos coeficientes de partição são desprezíveis e não afetam a composição final do sistema.

3.6. Programação e estratégia experimental seguida nesta tese

Para facilitar a compreensão do trabalho experimental realizados nesta tese são definidas as etapas de trabalho e seus principais objetivos:

1ª Etapa - Nesta primeira etapa, após a fermentação foi realizado um estudo da capacidade de filtração da membrana de polisulfona de tamanho de poro 0,2 μm . Este estudo teve como objetivo analisar o comportamento do fluxo e da formação da camada de gel em relação à temperatura, pressão e velocidade de fluxo.

2ª Etapa - Nesta etapa o caldo pré-tratado pela membrana de microfiltração 0,2 μm foi submetido à ultrafiltração em membrana de tamanho de poro de 50 e 3 kDa. Para ambas as membranas de ultrafiltração foram estudadas a influência da pressão transmembrana no fluxo de permeado e na formação da camada de gel.

3ª Etapa - Após o pré-tratamento do caldo com a membrana de microfiltração de tamanho de poro de 0,2 μm foi realizado uma extração do tipo S DFA. Após a separação das fases foi filtrado numa membrana de ultrafiltração de tamanho de poro de 50 kDa a fase de topo rica em PEG. Além de analisar o fluxo de permeado e a formação da camada de gel, foi avaliada a capacidade de re-extração do AC da fase de topo pela membrana de ultrafiltração. Nesta etapa também foi analisado o efeito da adição de etanol para precipitação de sais presentes na fase de topo.

4ª Etapa - Após o pré-tratamento do caldo com a membrana de microfiltração de tamanho de poro de 0,2 μm , cujo permeado coletado foi filtrado numa membrana de ultrafiltração de tamanho de poro de 3 kDa. Após o tratamento do caldo pelas duas membranas foi realizada uma extração do tipo S DFA. A fase de topo do S DFA foi submetida ao processo de troca iônica para re-extração do AC da fase rica em PEG. Objetivo desta etapa foi definir a viabilidade do processo de troca iônica na re-extração do AC da fase rica do S DFA. Também foram realizados estudos da adição de etanol para precipitação de sais presentes na fase de topo.

5ª Etapa - Nesta etapa foi realizado um planejamento fatorial para otimização do SDFa. Onde se analisou as melhores condições de extração e purificação do AC dentro de uma faixa de trabalho pré-determinada.

6ª Etapa - Análise da hidrólise do AC no SDFa, nesta etapa utilizou-se o AC proveniente do produto farmacêutico Clavulin® e o caldo pré-tratado com membrana de UF de 3 kDa. Objetivou-se nesta etapa, além da determinação da taxa de degradação do AC no SDFa, analisar a influência do PEG na velocidade de degradação do AC no SDFa.

7ª Etapa – Na etapa final do trabalho foi analisada a viabilidade do sistema contínuo de SDFa para extração e purificação do AC.

Na Figura 3.17 pode-se observar o diagrama dos estudos realizados. Em cada etapa foram realizados ensaios experimentais que permitiram determinar parâmetros que possibilitam um processo contínuo de extração utilizando os sistemas de membranas, SDFa e de troca iônica.

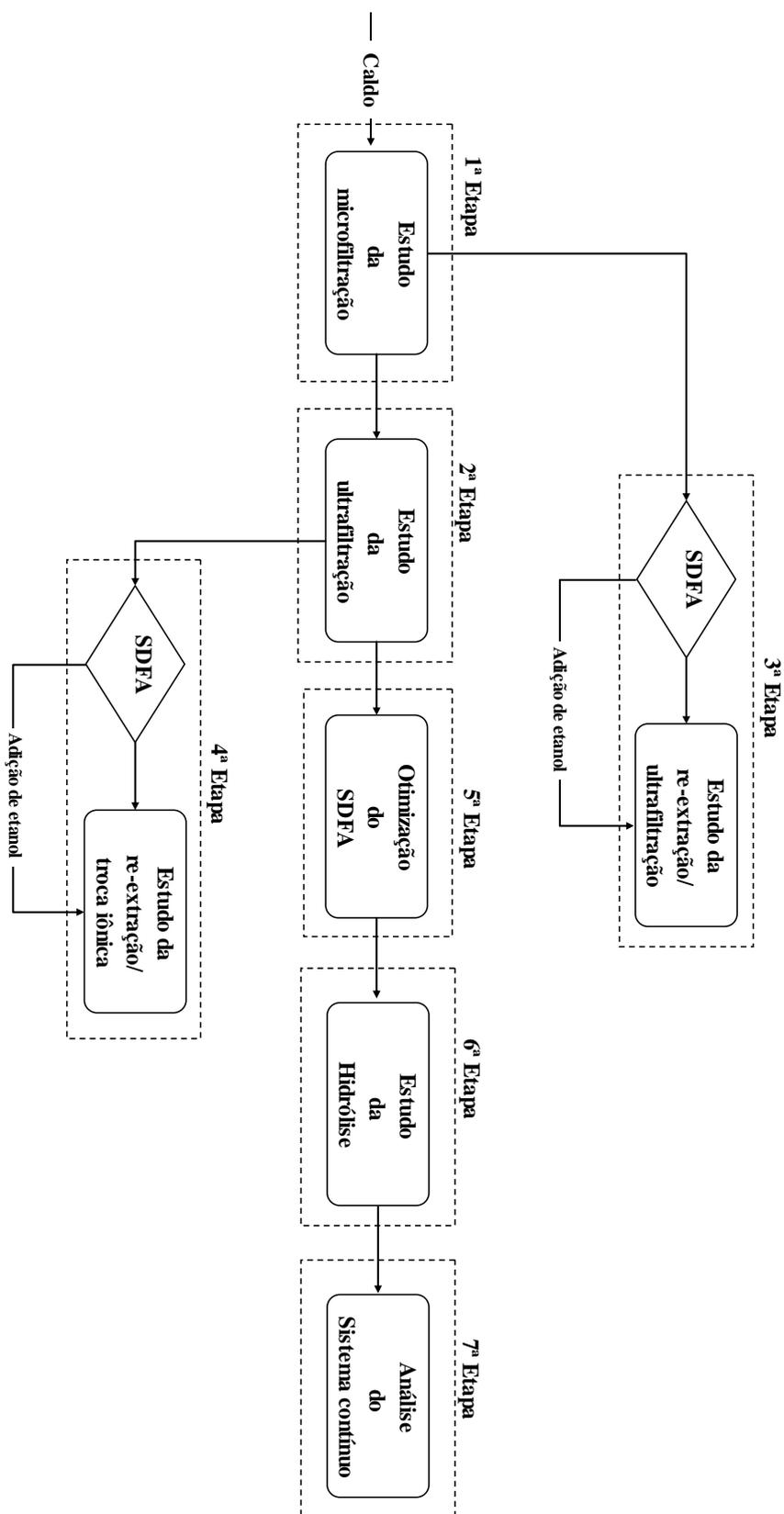


Figura 3.17. Diagrama das etapas de estudos experimentais desenvolvido neste trabalho.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Caracterização da membrana

Inicialmente foram determinadas as resistências intrínsecas das membranas novas (R_m), fazendo-se experimentos com água destilada. Com esses valores de resistências foram estudados os comportamentos dos fluxos de permeados das membranas utilizadas para as filtrações das suspensões (caldos fermentados) e soluções (caldos microfiltrados). A importância desses experimentos está no fato que membranas novas não possuem substâncias residuais adsorvidas (resistência irreversível), as quais são responsáveis por uma resistência adicional. Mesmo que as membranas em uso sejam submetidas corretamente ao método de lavagem, muitos componentes ainda permanecem aderidos a sua estrutura.

Foram submetidas aos ensaios as membranas de microfiltração de 0,2 e 0,1 μm de tamanho poro e as membranas de ultrafiltração com 50 kDa, 30 kDa, 3 kDa e 1 kDa de tamanho de poro, a temperatura de 25° C. JIRARATANANON; CHANACHAI (1996) verificaram, em seus estudos, que a resistência hidráulica da membrana de polisulfona é constante, independente da condição de vazão e temperatura de operação. Através da linearização do modelo proposto para a descrição do comportamento do fluxo de permeado (Equação 3.24), neste caso a água, foi possível, a partir dos dados experimentais do fluxo de permeado com a pressão, determinar os valores de R_m para cada membrana. Estes resultados encontram-se apresentados na Tabela 4.1.

Tabela 4.1. Valores das resistências hidráulicas das membranas de polisulfona (R_m), a temperatura de 25° C.

Membrana	Modelo	MWCO	Nº de fibras ocas	R_m (m^{-1})
MF	CFP-2-E-3X2MA	0,2 μm	6	$2,14 \times 10^{11}$
MF	CFP-1-E-55A	0,1 μm	1250	$9,86 \times 10^{11}$
UF	UFP-50-E-55	50 kDa	6	$3,32 \times 10^{12}$
UF	UFP-30-E-55	30 kDa	1250	$2,79 \times 10^{13}$
UF	UFP-3-E-3MA	3 kDa	6	$2,14 \times 10^{13}$
UF	UFP-1-C-9	1 kDa	1300	$3,61 \times 10^{14}$

MF-microfiltração; UF-ultrafiltração.

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 4.1 foi possível constatar que o valor de R_m é crescente com a diminuição do tamanho de poro da membrana. No entanto, a quantidade de fibra oca do cartucho teve influência na determinação da resistência da membrana de tamanho de poro de 30 kDa, pois a resistência de escoamento do permeado pelas fibras passa a exercer influência na resistência hidráulica do cartucho. A Figura 4.1 mostra a regressão linear dos fluxos de permeados das membranas de polisulfona.

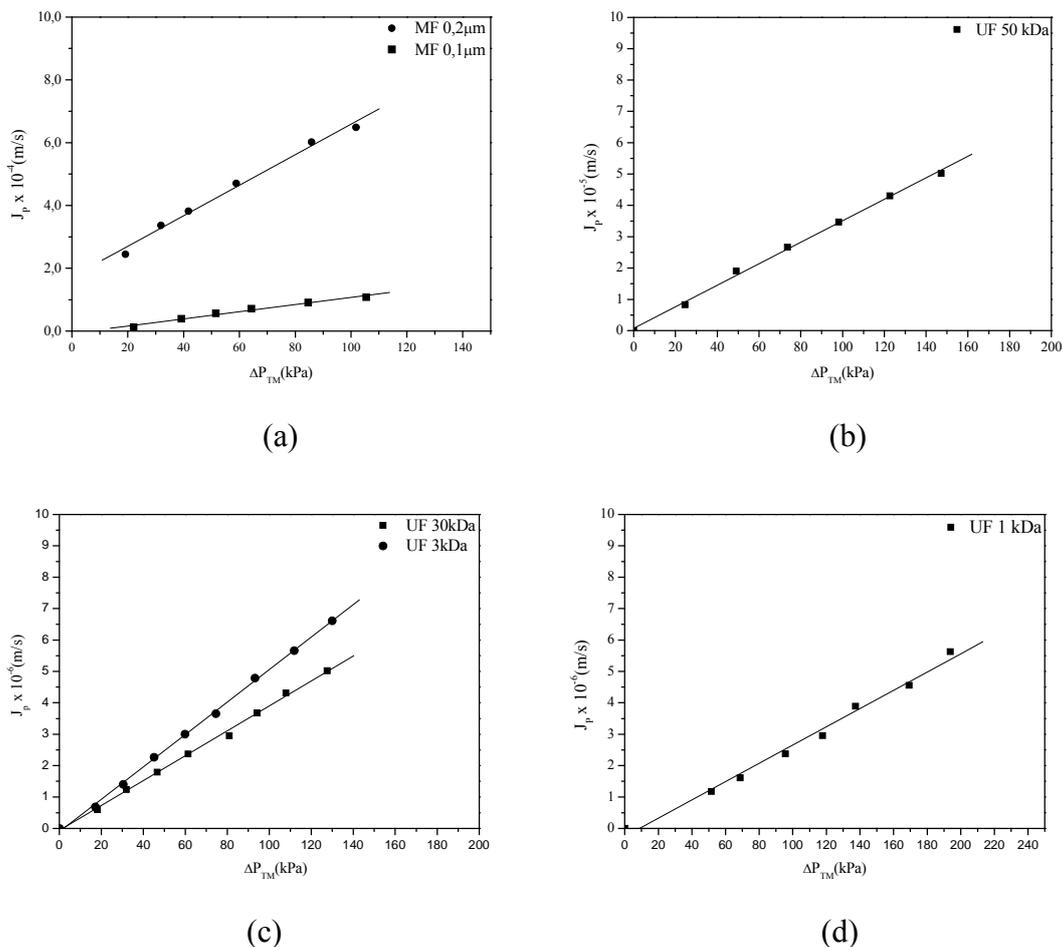


Figura 4.1. Linearização da Equação 3.23 e seu ajuste em relação aos dados experimentais dos fluxos de permeados das membranas de polisulfona, a 25° C. a) MF de 0,2 μm e 0,1 μm ; b) UF de 50 kDa; c) UF de 30 kDa e 3 kDa; d) UF de 1 kDa.

A partir da determinação das resistências das membranas foi possível determinar um outro parâmetro importante no processo de ultrafiltração: a resistividade da camada de gel (J). Tais parâmetros auxiliam na modelagem e na previsão do

comportamento do fluxo de permeação e na formação da camada gel no processo em questão.

4.1.1. Experimentos com a membrana de microfiltração 0,2 μm

Os resultados obtidos na microfiltração do caldo fermentado são apresentados na Tabela 4.2. e o comportamento do fluxo de permeado estão demonstrados na Figuras 4.2 e 4.5.

Tabela 4.2. Condições operacionais utilizadas e dados obtidos nos experimentos da MF de 0,2 μm , dos caldos de fermentação de AC.

Exp.	Condições iniciais de operação					Dados experimentais obtidos				
	T (°C)	P_{TM} (kPa)	$Q^{(a)}$ (L.h ⁻¹)	$K_c^{(b)}$ (Pa.s ⁿ)	$C_{x, inicial}$ (g.L ⁻¹)	V_p (L)	$t_{op}^{(c)}$ (h)	$C_{x, final}$ (g.L ⁻¹)	J_{ps} (L.h ⁻¹ .m ⁻²)	I_{ps} x10 ¹⁷ (m ⁻²)
M1	11,0	98,0	21,6	1,1	4,0	0,66	0,66	203,15	3,3	0,43
M2	11,0	122,0	43,5	1,6	2,4	0,77	0,77	100,23	5,6	0,20
M3	20,0	122,0	21,6	0,5	2,0	1,18	1,18	24,75	3,3	0,70
M4	20,0	98,0	21,6	0,3	1,8	1,12	1,12	18,70	3,1	0,35
M5	20,0	98,0	43,5	0,1	2,5	0,93	0,93	7,74	2,7	0,60
M6	20,0	39,2	43,5	0,3	1,3	0,93	0,93	20,79	1,4	1,00

a) Q - vazão de alimentação; b) Em relação amostra inicial; c) t_{op} - tempo de operação.

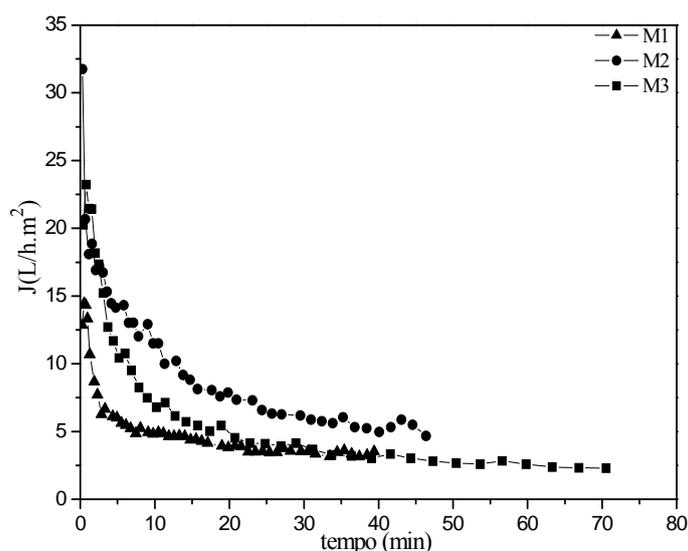


Figura 4.2. Fluxo de permeado da MF de 0,2 μm com o tempo de filtração em diferentes condições operacionais para os experimentos M1, M2, M3.

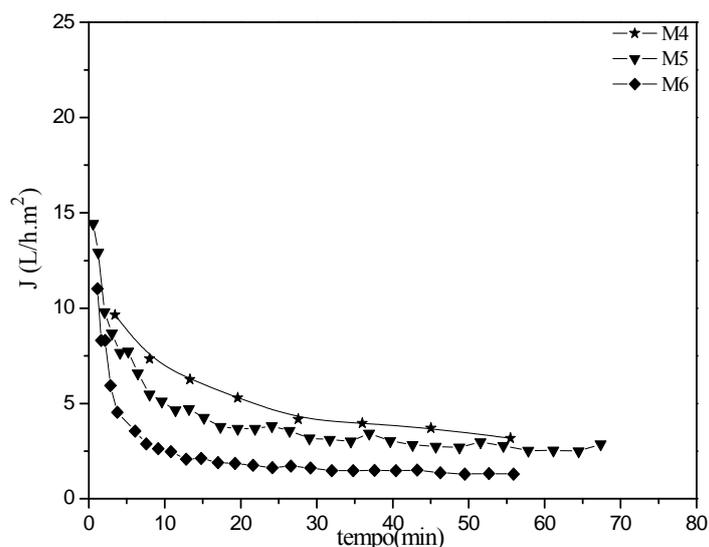


Figura 4.3. Fluxo de permeado da MF de 0,2 μm com o tempo de filtração em diferentes condições operacionais para os experimentos M4, M5, M6.

Com os dados da Tabela 4.2 pode-se avaliar o efeito da pressão transmembrana (P_{TM}) em relação a fluxo de permeado no estado pseudo-estacionário (J_{ps}). Para esta comparação utilizam-se os resultados dos experimentos M3 e M4 que na temperatura de 20° C e vazão de alimentação de 21,6 L.h⁻¹. O valor de J_{ps} não teve um aumento significativo com o aumento da pressão, permanecendo praticamente constante nos dois casos. Cabe lembrar que o comportamento de J_{ps} em função do aumento ou diminuição da pressão transmembrana é diretamente proporcional à resistividade da camada de gel no estado pseudo-estacionário (I_{ps}). Esta camada, por sua vez, é função da composição do meio, que pode ser caracterizada em função de suas propriedades reológicas. Comparando-se os ensaios M3 e M4, nota-se que há um aumento da formação de gel para o ensaio M3 como se observa na Tabela 4.2. Isto se deve ao fato da solução M3 ter, inicialmente, um valor de índice de consistência, K_c maior que a suspensão utilizada em M4. O valor de K_c é diretamente proporcional à concentração de células, sólidos solúveis e em suspensão, organelas e colóides entre outros. Sabendo-se que I_{ps} é diretamente proporcional à resistência específica da torta (α), que é função dos constituintes do material formador da torta, e da massa de torta formada (C_b), e que por sua vez está diretamente relacionada à concentração total na alimentação, pode-se dizer que a resistência do gel é diretamente relacionada ao valor de K_c , sendo assim, o

aumento da resistência do gel não permitiu um aumento considerável no fluxo de permeado com o aumento da P_{TM} .

O efeito da velocidade de escoamento no interior da membrana é apresentado na Figura 4.3, referentes aos ensaios M4 e M5. Este aumento de velocidade promove um aumento do turbilhonamento no escoamento diminuindo a resistência do coeficiente de transferência de massa na superfície do gel formado. No entanto, esse fato não resultou em um aumento de J_{ps} , que permaneceu praticamente o mesmo para os dois casos. Este efeito do escoamento é notado nos ensaios M1 e M2, onde se tem pequena diferença de P_{TM} e a vazão de operação de M2 é o dobro da M1 (Figura 4.2).

Nota-se que para os experimentos M1 e M2 foram verificados altos valores de K_c . O ensaio M2 apresenta uma particularidade no que se refere à composição do meio de cultura utilizado na etapa de fermentação, em que o cultivo foi encerrado ainda na fase de crescimento exponencial. Apesar de o caldo resultante ter alta concentração de células, que é observado pelo valor do K_c , muito dos substratos ainda não haviam sido convertidos em biomassa, ácido clavulânico e proteínas, este fato reflete o menor valor de I como pode se observar na Figura 4.4 e 4.5, em relação a todos os experimentos, com este menor valor se obteve o maior J_{ps} .

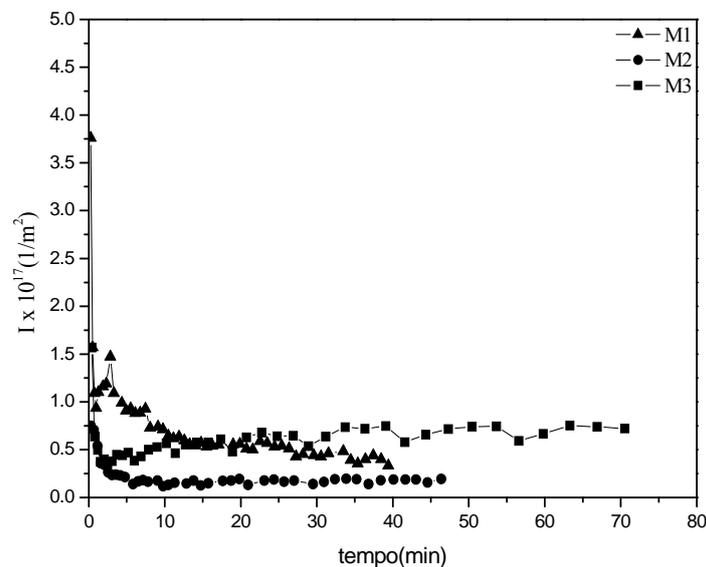


Figura 4.4. A resistividade da camada de gel (I) em função do tempo dos experimentos M1, M2 e M3.

O ensaio M1 foi resultado da filtração de um caldo realizado em uma fermentação com farinha desengordurada Prosan R[®] que apresenta em torno de 20 g de fibra/100 g de produto, enquanto que para todos os outros ensaios a fonte de nitrogênio utilizado foi Supro 783[®] cuja composição de fibras é de 2,18 g de fibra/100 g de produto. Novamente é observado que I_{ps} foi maior para a suspensão que apresentava K_c maior (Figura 4.4). Portanto, pode-se concluir que o fluxo J_{ps} é limitado pela formação de gel, R_c . Esta formação depende do valor do índice de consistência da suspensão, no entanto a qualidade do material que compõe o meio pode definir um maior ou menor valor para R_c independentemente do índice de consistência. Portanto, as características da composição do meio de cultivo é que promove maior ou menor formação do gel, que limita o processo.

Os resultados obtidos nos ensaios M5 e M6 demonstrados na Figura 4.5 vêm reforçar as conclusões anteriores. Para o ensaio M5 tem-se menor valor de K_c e maior valor de P_{TM} e o que permitiu maior valor de J_{ps} e menor valor de I_{ps} . Como era de se esperar, para que se consiga aumentar J_{ps} , é necessário trabalhar com P_{TM} maior, mas especial atenção deve ser dada ao índice K_c , e à qualidade do caldo que está relacionada ao tempo de cultivo, pois este é o fator limitante para a formação do gel, parâmetro este que controla o processo.

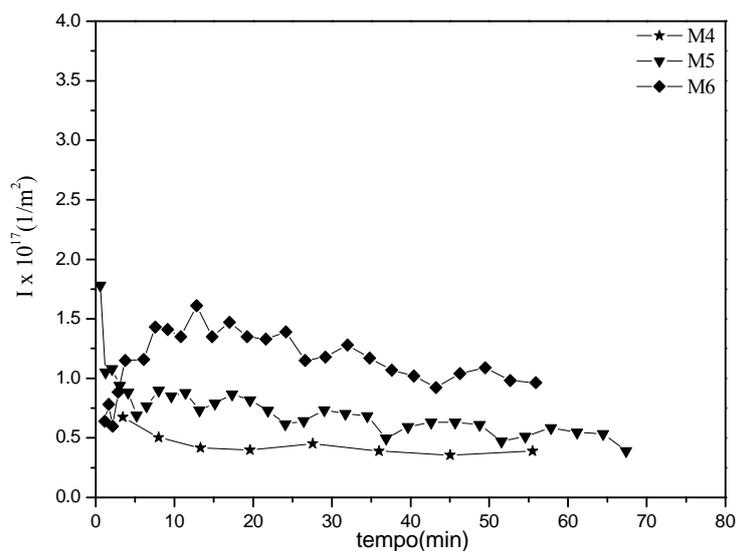


Figura 4.5. A resistividade da camada de gel (I) em função do tempo dos experimentos M4, M5 e M6.

Em relação à estabilidade da camada de gel pode-se observar nas Figuras 4.4 e 4.5 que após 10 min a camada de gel está completamente formada. Porém, quando os ensaios M5 e M6 são comparados verifica-se que a diminuição da pressão e o aumento da vazão de alimentação fazem com que haja arraste da camada de gel como pode se observar na Figura 4.5, indicando a influência destes dois parâmetros na formação da camada de gel. No entanto, independentemente das condições, a camada de gel tende a se estabilizar com o tempo de processo.

4.1.2. Experimentos com a membrana de ultrafiltração de 50 kDa

Os resultados de UF para membrana de 50 kDa estão apresentados na Tabela 4.3. Todos os experimentos foram feitos a 11° C e vazão de 21,6 L.h⁻¹. Os resultados mostraram um comportamento esperado em relação ao aumento da pressão e J_{ps} , isto é, fluxo aumenta com o aumento da pressão como mostra a Figura 4.6.

Tabela 4.3. Condições operacionais e dados obtidos nos experimentos de UF de 50 kDa, de caldos de fermentação de AC pré-tratado com a membrana de MF de 0,2 µm.

Exp.	Condições iniciais de operação				Dados experimentais obtidos			
	T (°C)	P_{TM} (kPa)	$Q^{(a)}$ (L.h ⁻¹)	μ (Pa.s)	V_p (L)	$t_{op}^{(b)}$ (h)	J_{ps} (L.h ⁻¹ .m ⁻²)	I_{ps} x10 ¹⁵ (m ⁻²)
U1	11,0	49,0	21,6	0,2	0,6	1,6	9,9	0,83
U2	11,0	73,6	21,6	0,2	0,5	1,6	13,5	0,80
U3	11,0	98,0	21,6	0,2	0,4	1,5	14,6	0,88

a) Q - vazão de alimentação. b) t_{op} - tempo de operação.

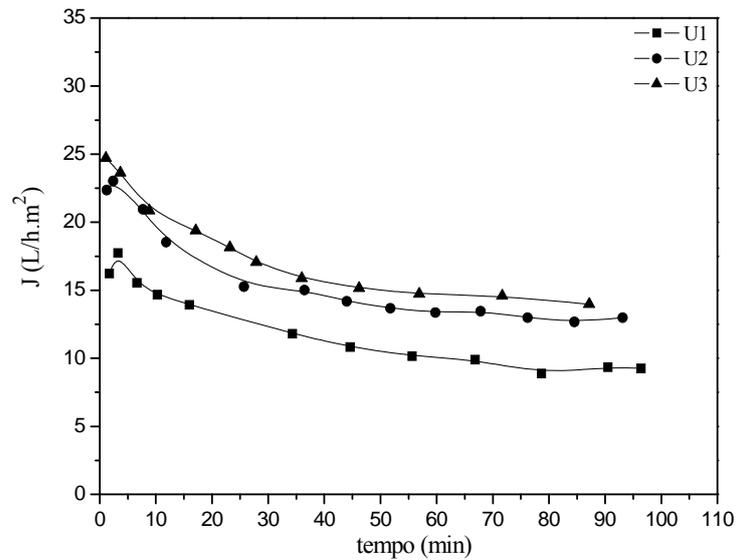


Figura 4.6. Fluxo de permeado da UF de 50 kDa com o tempo de filtração dos experimentos U1, U2 e U3 para diferentes pressões transmembrana.

A respeito da formação da camada de gel nestes experimentos de ultrafiltração, notou-se que todos os valores obtidos são inferiores aos valores para a MF. Este resultado tem relação com o tamanho de poro da membrana que retém uma maior quantidade de solúveis protéicos que a operação de MF. Esperava-se, no entanto, que com o aumento da P_{TM} os valores de I_{ps} aumentassem na mesma proporção. No entanto, observa-se que I_{ps} mantém-se constante depois da formação da camada de gel indicando a sua estabilidade. Isso sugere que durante o processo de ultrafiltração do caldo pré-tratado por membrana de microfiltração não há compressão da camada de gel, como mostra na Figura 4.7.

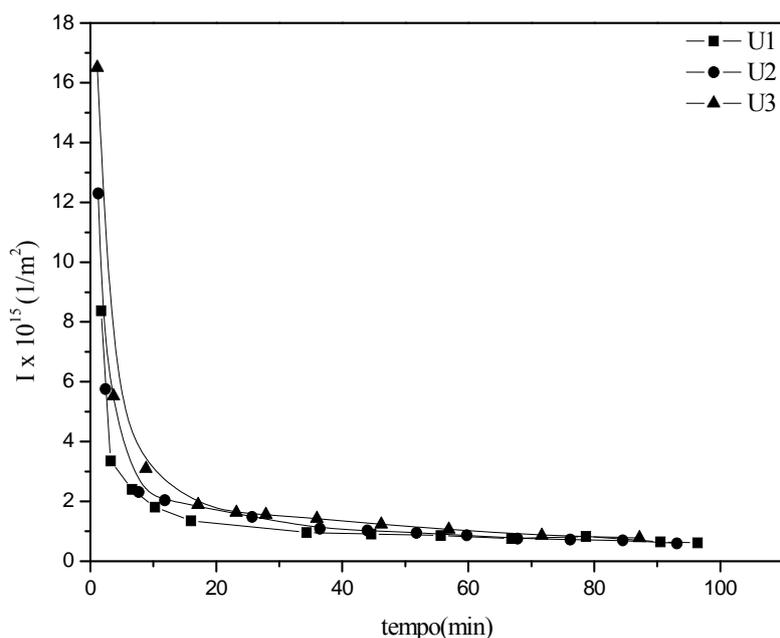


Figura 4.7. A resistividade da camada de gel (I) em função do tempo dos experimentos U1, U2 e U3.

Os valores mais altos de I_{ps} no início da ultrafiltração ocorrem devido ao período de preenchimento e acomodação de compostos nos poros e na superfície da membrana. Esta acomodação ocorre com o estabelecimento do escoamento do fluido em regime permanente através dos poros.

4.1.3. Experimentos com a membrana de ultrafiltração 3 kDa

Para os experimentos de UF realizados com membrana de 3 kDa, os resultados seguiram a tendência esperada. Esses resultados encontram-se na Tabela 4.4, os experimentos foram realizados para a mesma temperatura de 11° C e vazão de 21,3 L.h⁻¹. Os resultados mostraram o mesmo comportamento como obtido com a membrana de UF de 50 kDa em relação ao aumento da pressão e J_{ps} , isto é, fluxo aumenta com o aumento da pressão como mostra a Figura 4.8.

Os valores de I_{ps} obtidos para a membrana de 3 kDa foram próximos aos obtidos para a membrana de 50 kDa, indicando mesma retenção de material solubilizado pela membrana, tal como proteínas (Tabela 4.4 e Figura 4.9).

Tabela 4.4. Condições operacionais e dados obtidos nos experimentos de UF de 3 kDa, de caldos de fermentação de AC pré-tratado com a membrana de MF de 0,2 μm .

Exp.	Condições iniciais de operação				Dados experimentais obtidos			
	T ($^{\circ}\text{C}$)	P_{TM} (kPa)	$Q^{(a)}$ ($\text{L}\cdot\text{h}^{-1}$)	μ (Pa.s)	V_p (L)	$t_{op}^{(b)}$ (h)	J_{ps} ($\text{L}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$)	I_{ps} $\times 10^{15}(\text{m}^{-2})$
U4	11,0	73,6	21,6	0,2	0,2	1,6	11,9	0,89
U5	11,0	98,0	21,6	0,2	0,3	1,6	13,3	0,83
U6	11,0	122,0	21,6	0,2	0,3	1,5	15,2	0,88

a) Q - vazão de alimentação. b) t_{op} - tempo de operação.

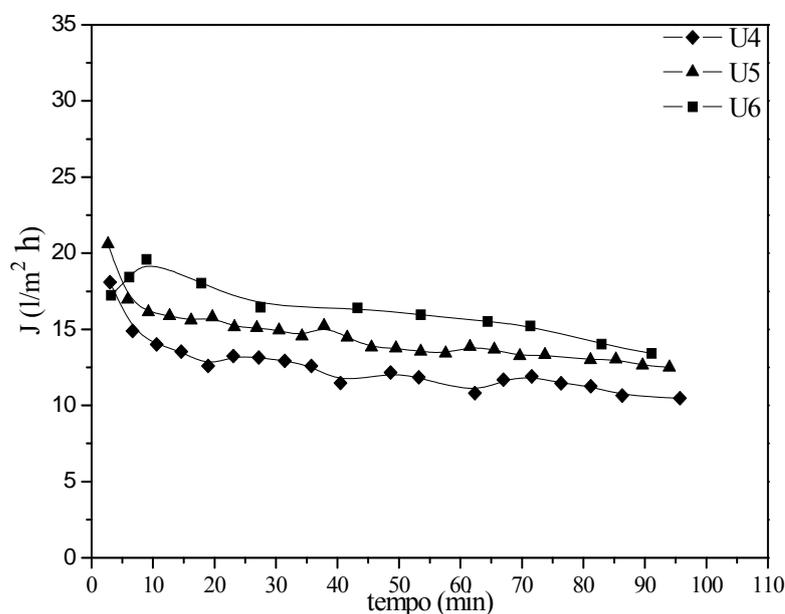


Figura 4.8. Fluxo de permeado da UF de 3 kDa com o tempo de filtração dos experimentos U4, U5 e U6 para diferentes pressões transmembrana.

Apesar da membrana de UF de 3 kDa apresentar valores semelhantes de I_{ps} , ela fornece também um fluxo final J_{ps} , inferior aos obtidos para a membrana de 50 kDa nos valores de P_{TM} de 73,6 e 98 kPa, como se pode observar na Figura 4.9 e na Tabela 4.4. Isto se deve à segunda resistência encontrada no processo, a resistência da própria membrana, que é maior para tamanhos de poro menores.

Pelos resultados obtidos a membrana de UF de 50 kDa seria a mais indicada para o tratamento do filtrado da membrana de microfiltração de 0,2 μm , sob o ponto de vista de operação mecânica, visto que promove um maior fluxo em comparação com a

UF de 3 kDa. No entanto, cabe o estudo da capacidade de purificação de cada membrana. Este estudo foi realizado e será apresentado na etapa de do estudo da influência do pré-tratamento do caldo pelas membranas de polisulfona na cromatografia por troca iônica com a resina Streamline QXL.

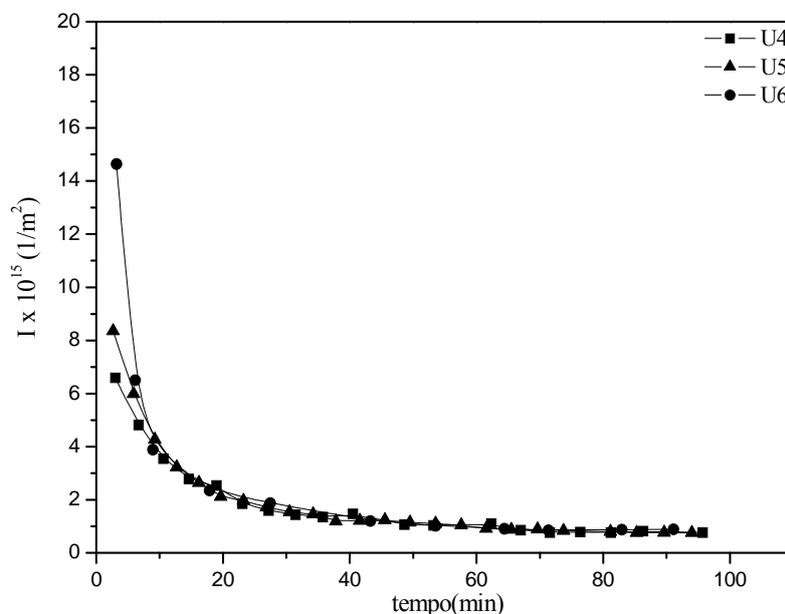


Figura 4.9. A resistividade da camada de gel (I) em função do tempo dos experimentos U4, U5 e U6.

4.1.4. Perdas de ácido clavulânico

Em nenhuma das operações de filtração foi verificada a capacidade de se concentrar o AC, tanto no retido quanto no permeado. As perdas de AC nos processos de MF e UF foram calculadas a partir de dados de concentração na entrada e saída das membranas (permeado), com as quais se realizou um balanço de massa no processo permitindo avaliar as fontes das perdas.

As perdas por degradação foram estimadas de acordo com os dados cinéticos de degradação apresentados por BERSANETTI *et al.*, (2005). Em todos os casos a perda por degradação não superou a 2% do total.

No processo de MF as perdas tiveram uma média de 20% enquanto que nos processos de UF não superaram a 10%. Entendem-se como perdas no processo as massas de AC que ficaram retidas nas válvulas, interior dos cartuchos de filtração bem

como as massas de AC retidas na superfície de gel formado nas filtrações. Ressalta-se que o cartucho de MF apresenta uma maior área de escoamento retendo, naturalmente uma maior quantidade de AC cuja determinação da concentração não pode ser realizada no presente trabalho. Estas perdas podem ser minimizadas à medida que se façam ajustes operacionais no sistema. O resultado mais importante está no fato de que o processo não contribui com perdas por degradação como é o caso da troca iônica e da extração com solventes orgânicos que exigem redução de pH.

4.1.5. Conclusões da etapa de filtração

Como conclusões revelantes da pesquisa realizada com as membranas de microfiltração e ultrafiltração se pode dizer que:

1. Os estudos de filtração mostraram que a resistividade da camada de gel formada na microfiltração está diretamente relacionada às condições iniciais do caldo de fermentação, condições estas que influenciam diretamente no declínio do fluxo durante a filtração e na resistência da membrana. Em relação ao permeado verificou-se 100% de rejeição das células.

2. Na ultrafiltração em membranas de 3 e 50 kDa o aumento de pressão proporciona um aumento de fluxo permeado. Este o aumento não proporciona um aumento da polarização na camada de gel.

3. O conjunto de experimentos (MF e UF) evidência que a determinação das condições iniciais do caldo a ser filtrado é fundamental para obter um alto fluxo de permeado, logo pode definir-se pressão transmembrana intermediárias e velocidades tangenciais maiores, que permitam aumentar a vida útil da membrana sem perdas significativas na produtividade.

4. O processo de filtração por membranas com escoamento tangencial permite minimizar as perdas por degradação. No entanto, especial atenção tem que ser dada na operação do sistema, a fim de que não se tenha grandes perdas por formação de zonas mortas nas unidades. A escolha das condições de operação, de tal forma a minimizar a formação do gel, pode diminuir as perdas nos processos.

5. Assim, os melhores resultados para MF são: trabalho com P_{TM} de 98 kPa a temperatura de 11° C e vazão de alimentação de 21,6 L.h⁻¹. Para as UF a temperatura de

11° C, vazão de alimentação de 21,6 L.h⁻¹ foram adequadas e a P_{TM} recomendada não deve exceder a 80 kPa.

4.2. Seleção dos sistemas de duas fases aquosas

Nesta etapa do trabalho o objetivo foi fazer teste com as membranas de filtração para avaliar a capacidade de re-extração do AC da fase de topo rica em PEG. Porém, antes dos testes com a membrana a escolha de um sistema de duas fases aquosas foi fundamental para o trabalho. A escolha S DFA foi baseada em trabalho como o de SHANG *et al.* (2004) que demonstra que a partição de alguns aminoácidos, que são resíduos presentes no caldo de AC, tem um aumento substancial para PEGs de massa molares superiores 6000 e pHs maiores que 7 favorecendo a fase rica em PEG, devido à mudança de interação eletrostática e da hidrofobicidade. No entanto, para PEGs de massa molares inferiores 6000, valores do coeficiente de partição para o AC são superiores 1,5 independente do pH (VIDEIRA; AIRES-BARROS, 1994).

Aumentando a linha de amarração (20-55) há aumento no coeficiente de partição (1,5-114) e na recuperação (97-99%) do ácido clavulânico (VIDEIRA; AIRES-BARROS, 1994). Porém, o aumento da linha de amarração faz que a fração mássica de PEG na fase de topo aumente, e como consequência, ocorre um aumento da viscosidade dificultando o processo de re-extração (RAHBARI-SISAKHT *et al.*, 2003). Baseado nestes trabalhos desenvolvidos e no trabalho desenvolvido por HIRATA (2003) foi elaborado os sistemas de duas fases aquosas com massas molares 400, 600, 1000, 4000 e 6000.

4.3. Re-extração do AC da fase de topo do S DFA

4.3.1. S DFA para experimentos de re-extração do AC por ultrafiltração

Após a definição das composições de PEG e fosfato utilizado no S DFA foram realizados os experimentos para extração do AC. Todos os experimentos em S DFA foram realizados a temperatura de 22° C e os caldos de AC pré-tratados com membrana de microfiltração de 0,2 µm, senda fase rica em PEG e AC utilizada nos experimentos de re-extração por membrana de ultrafiltração de tamanho de poro de 50 kDa. Na

Tabela 4.5 apresentam-se as composições dos sistemas e os resultados obtidos para extração do AC pelo S DFA.

Tabela 4.5. Resultados experimentais obtidos da extração do AC por S DFA, a temperatura de $22 \pm 2^\circ \text{C}$.

mPEG	PEG/fosfato (% m/m)	$C_{AC, amostra}$ (mg.L ⁻¹)	$C_{AC, topo}$ (mg.L ⁻¹)	$C_{AC, fundo}$ (mg.L ⁻¹)	K (-)	Rendimento (%)		
						Topo	Fundo	Total
400	20/20	1007,0	269	14	19,0	96,3	3,9	100
600	15/15	802,0	236	105	2,3	80,9	19,1	100
1000	15/15	871,0	299	75	4,0	77,5	16,4	93,9
4000	15/15	685,0	278	61	4,6	79,9	19,7	99,6
6000	15/15	700,0	278	69	4,9	77,0	23,0	100

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 4.5, é possível verificar que o coeficiente de partição (K) foram superiores a 1,5 e o rendimento da fase de topo foi acima de 75% para todos os PEGs. Sendo que para PEGs de massas molares menores 400 e 600 os rendimentos da fase de topo foram entre 80,9 e 96,63%. Para todos os PEGs o rendimento total do S DFA foi acima de 93%, como determinado por VIDEIRA; AIRES-BARROS (1994) utilizando o sal de ácido clavulânico.

4.3.2. Re-extração do AC da fase de topo por ultrafiltração

A Tabela 4.6. apresenta os resultados obtidos da re-extração do AC da fase rica em PEG utilizando a membrana de ultrafiltração de tamanho de poro de 50 kDa. Os experimentos foram realizados à temperatura de 11°C , vazão de entrada no cartucho de $6,8 \text{ L.h}^{-1}$ e pressão transmembrana de 1,25 kPa.

Pode se observar na Tabela 4.6 uma rejeição (R_{PEG}) acima de 30% para os PEGs. Este fato deve estar relacionado à formação da camada de gel, que é resultado de um acúmulo de solutos próximo da membrana, uma vez que as concentrações de PEG do retido e do permeado diminuíram para todos os PEGs. O mesmo fato é observado para o AC, o qual teve uma rejeição (R_{AC}) acima de 30% (Tabela 4.6).

Tabela 4.6. Análise de PEGs e AC na re-extração do AC por ultrafiltração 50 kDa para diferentes PEGs, a temperatura de 11° C.

mPEG	$C_{PEG, topo}$ (g.L ⁻¹)	$C_{PEG, ret.}$ (g.L ⁻¹)	$C_{PEG, perm.}$ (g.L ⁻¹)	$C_{AC, ret.}$ (mg.L ⁻¹)	$C_{AC, perm.}$ (mg.L ⁻¹)	R_{PEG} (%)	R_{AC} (%)
400	679,7	346,5	315,6	86,0	163,0	54,0	39,0
600	368,3	179,7	259,1	14,0	55,0	30,0	77,0
1000	343,3	194,6	194,1	137,0	196,0	43,0	31,0
4000	1012,0	192,7	165,3	156,0	167,0	84,0	41,0
6000	204,02	135,9	101,5	152,9	136,0	50,0	51,0

Nestes ensaios foi analisada a concentração de fósforo tanto no retido como no permeado, na qual, esta diretamente relacionada à concentração de sais de fosfato na fase de topo, como mostra a Tabela 4.7 não houve rejeição do fosfato independente do PEG utilizado para o experimento de re-extração.

Tabela 4.7. Análise de fósforo da re-extração do AC por ultrafiltração para diferentes PEGs, a temperatura de 11° C.

mPEG	$C_{Fos.topo}$ (g.L ⁻¹)	$C_{Fos.ret.}$ (g.L ⁻¹)	$C_{Fos.perm.}$ (g.L ⁻¹)	R_{Fos} (-)
400	13,19	13,43	13,67	0,00
600	12,44	10,50	12,30	0,00
1000	14,58	13,82	13,02	0,00
4000	16,15	11,95	16,68	0,00
6000	15,37	13,23	14,20	0,00

A formação da camada de gel, constituída de PEG juntamente com outros constituintes (biomoléculas) presente na fase de topo resulta não só no aumento na retenção do AC, mas também uma redução do fluxo de permeado durante o processo de filtração para os PEGs 400, 600 e 1000 como pode-se observar na Figura 4.10. Para PEG 4000 o fluxo se manteve pseudo-estacionário. No entanto, para o PEG 6000 ocorreu uma baixa permeação no processo nas condições de operação do sistema de ultrafiltração, foi permeado um volume de 15 mL em 2,5 h de operação, indicando formação de uma camada gel de difícil permeação. Dessa maneira, não foi conveniente relatar o comportamento do fluxo de permeação em função do tempo de operação.

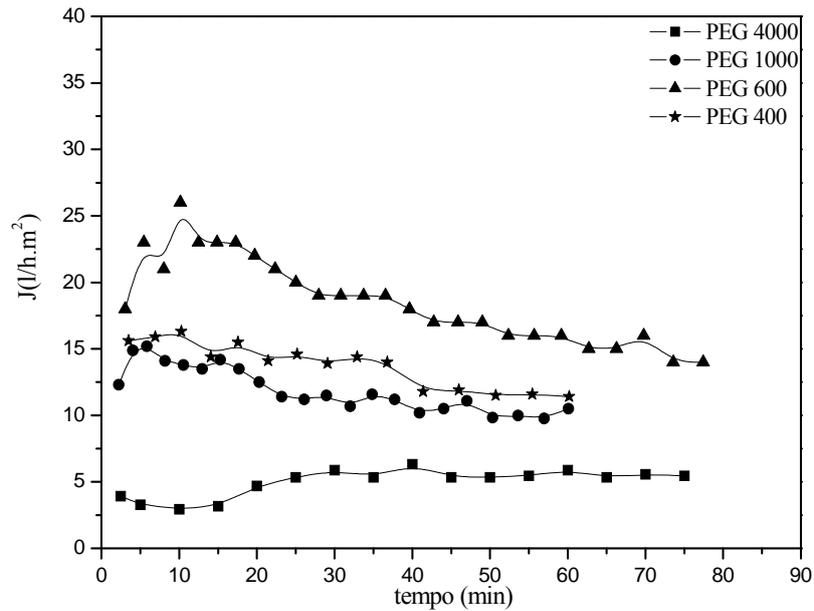


Figura 4.10. Fluxo de permeado da re-extração do AC em função do tempo de filtração para diferentes PEGs, a temperatura de 11° C.

A resistividade da camada de gel é constante para ambos PEGs após a formação da camada de gel indicando a sua estabilidade como pode se observar na Figura 4.11.

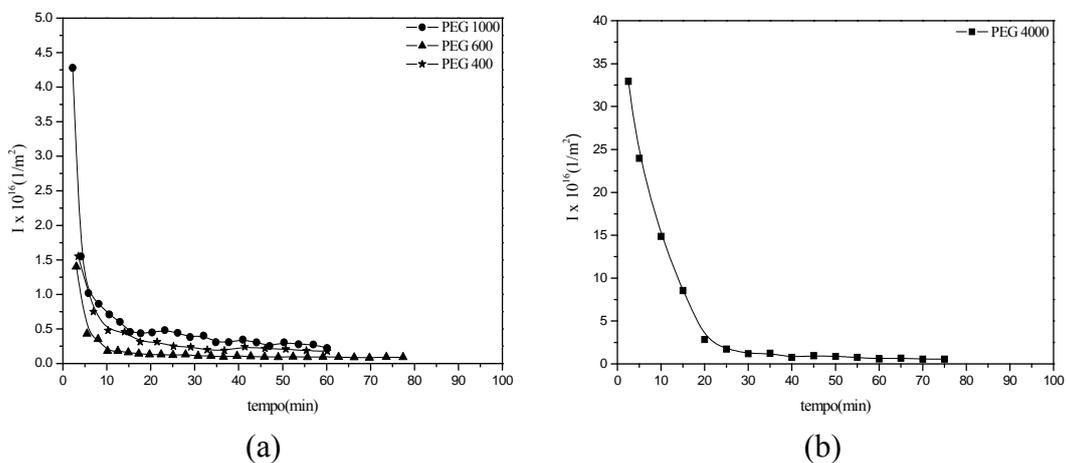


Figura 4.11. A resistividade da camada de gel (I) da re-extração do AC em função do tempo, a temperatura de 11° C: (a) PEG 1000, 600 e 400; b) PEG 4000.

4.3.3. Efeito do etanol na re-extração do AC da fase de topo por ultrafiltração

Nesta etapa do trabalho foi adicionado etanol 1,8:1 (v/v) de volume de fase de topo. A presença do etanol influencia na formação da camada de gel e no fluxo de permeado. Segundo os estudos realizados por ZAIDI; KUMAR (2004), a adição do etanol na solução PEG mais água retarda a formação da camada de gel. Na Tabela 4.8 tem-se os resultados dos ensaios em S DFA realizados a temperatura de 22° C, que se mostraram semelhantes aos resultados obtidos na etapa anterior. A fase de topo foi utilizada para os experimentos de re-extração do AC por ultrafiltração na presença de etanol.

Tabela 4.8. Resultados experimentais obtidos da extração do AC por S DFA para ensaios na presença de etanol, a temperatura de 22 ± 2° C.

mPEG	PEG/fosfato (%m/m)	$C_{AC, amostra}$ (mg.L ⁻¹)	$C_{AC, topo}$ (mg.L ⁻¹)	$C_{AC, fundo}$ (mg.L ⁻¹)	$C_{AC, Etanol}^{(a)}$ (mg.L ⁻¹)	K (-)	Rendimento (%)		
							Topo	Fundo	Total
400	20/20	931,0	256,0	11,0	98,0	23,3	93,8	3,2	97,0
600	15/15	803,0	233,0	108,0	94,0	2,2	79,1	18,8	97,9
1000	15/15	1029,0	327,0	69,0	131,0	4,7	77,1	11,7	88,8
4000	15/15	685,0	277,0	53,0	102,0	5,2	77,6	17,5	95,1
6000	15/15	700,0	277,0	50,0	102,0	5,5	76,7	16,2	92,9

a) Concentração de AC após a precipitação dos sais de fosfato por etanol da fase de topo.

Após adição do etanol e precipitação dos sais presentes na fase de topo, a solução obtida foi submetida à ultrafiltração por uma membrana de 50 kDa, temperatura 11° C, vazão de entrada no cartucho de 6,8 L.h⁻¹ e pressão transmembrana de 1,25 kPa. A Tabela 4.9 mostra que com a adição do etanol ocorreu uma diminuição da rejeição dos PEGs 400, 1000, 4000 e 6000 e pela membrana de ultrafiltração. Fato este observado para a rejeição do AC (R_{AC}) como mostra a Tabela 4.9. Esta rejeição do AC pode estar relacionada à retenção do AC junto com PEG na membrana como já observada no item 4.3.4.

Na Tabela 4.10 pode se observar que adição do etanol na fase rica em PEG precipitou 95% do fosfato presente na fase de topo para os PEGs de menores massas molares 400, 600 e 1000. Para os PEGs de maiores massas molares a precipitação ficou acima de 50%. Como na etapa anterior de re-extração de AC por ultrafiltração, nesta não ocorreu rejeição do fosfato juntamente com PEG.

Tabela 4.9. Resultados da re-extração do AC por ultrafiltração na presença do etanol para diferentes PEGs, a temperatura de 11° C.

mPEG	$C_{PEG, topo}$ (g.L ⁻¹)	$C_{PEG, etanol}$ (g.L ⁻¹)	$C_{PEG, ret.}$ (g.L ⁻¹)	$C_{PEG, perm.}$ (g.L ⁻¹)	$C_{AC, ret.}$ (mg.L ⁻¹)	$C_{AC, perm.}$ (mg.L ⁻¹)	R_{PEG} (-)	R_{AC} (-)
400	434,37	187,60	118,02	140,79	82,0	82,0	0,25	0,16
600	305,61	183,21	112,17	117,07	77,0	84,0	0,36	0,10
1000	250,69	118,11	97,56	92,20	99,0	115,0	0,22	0,12
4000	1012,10	237,26	166,58	144,74	98,0	95,0	0,39	0,07
6000	235,05	150,42	143,39	131,16	99,0	91,0	0,13	0,11

Tabela 4.10. Análise de fósforo na re-extração do AC por ultrafiltração na presença do etanol para diferentes PEGs, a temperatura de 11° C.

mPEG	$C_{Fos, topo}$ (g.L ⁻¹)	$C_{Fos, etanol}$ (g.L ⁻¹)	$C_{Fos, ret.}$ (g.L ⁻¹)	$C_{Fos, perm.}$ (g.L ⁻¹)	R_{Fos} (-)
400	12,83	0,66	0,85	0,87	0,00
600	27,21	0,62	0,75	0,75	0,00
1000	15,44	0,69	0,87	0,76	0,00
4000	27,21	11,05	17,65	9,40	0,00
6000	15,96	8,43	7,67	8,19	0,00

A adição de etanol fez com que o fluxo mantivesse constante, apenas aumentando o fluxo de permeado como se observa na Figura 4.12. Este aumento no fluxo está relacionado à diluição da fase de topo pelo etanol. No entanto, mesmo diluindo a fase de topo pelo etanol o PEG 6000 apresentou baixa permeação inviabilizando ao processo de filtração.

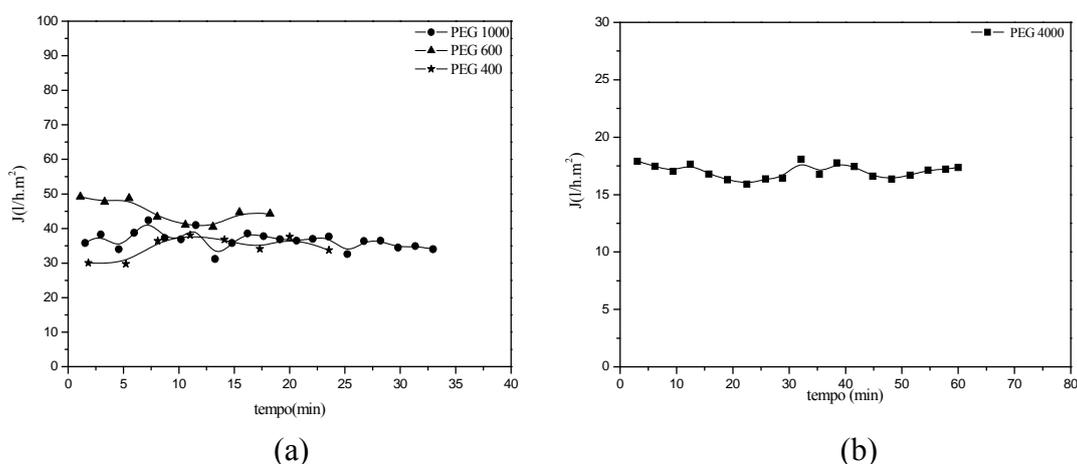


Figura 4.12. Fluxo de permeado da re-extração do AC para diferentes PEGs em função do tempo na presença do etanol e a temperatura de 11° C: (a) PEG 1000, 600 e 400; b) PEG 4000.

O efeito da adição do etanol no comportamento da camada de gel pode ser observado na Figura 4.13. Apenas para o PEG 4000 o efeito foi significativo na camada de gel tanto como na formação e resistividade (I), que apresentou um I_{ps} de $0,06 \times 10^{16} \text{ m}^{-2}$, enquanto que, na etapa anterior de re-extração o I_{ps} foi de $0,6 \times 10^{16} \text{ m}^{-2}$.

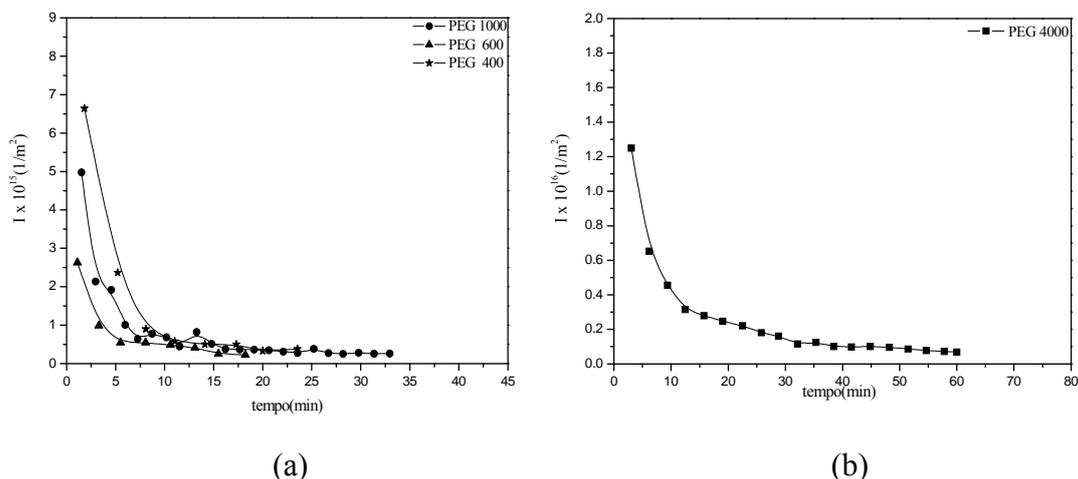


Figura 4.13. A resistividade da camada de gel (I) da re-extração do AC em função do tempo na presença do etanol e a temperatura de 11°C : (a) PEG 1000, 600 e 400; b) PEG 4000.

4.4. Re-extração do AC da fase de topo da S DFA por resina de troca iônica

Após análise experimental da re-extração do AC da fase de topo por membrana de ultrafiltração pode se concluir na inviabilidade da re-extração através deste processo. Uma alternativa para o processo de re-extração do AC da fase de topo do S DFA é uso de resinas de trocadoras de íons, pois geralmente as biomoléculas carregadas ionicamente podem trocar os íons presentes nos sítios carregados das resinas. Uma vez que os PEGs são livres de cargas podem passar pelas cargas da resina sem sofrer forte atração e as biomoléculas podem então ser eluídas da coluna (ALBERTSSON, 1986). Geralmente são disponibilizadas várias resinas comerciais e para este estudo foram utilizadas duas resinas:

- a) A resina de troca iônica Amberlite IRA-400Cl (ROHM & HAAS) cujos trabalhos iniciados no DEQ-UFSCar abordaram a sua utilização para a purificação do AC.

- b) A resina de troca iônica Streamline Q XL (AMERSHAM BIOSCIENCES) a qual nenhum trabalho foi realizado para avaliar a capacidade de adsorção do AC contido no caldo.

Assim, inicialmente, a resina Streamline Q XL foi testada para avaliar a sua capacidade de adsorção do AC do caldo pré-tratado por membrana de ultrafiltração 3 kDa, assim como já demonstrados nos trabalhos de BARBOZA *et al.* (2002b) e MAYER *et al.* (1997) para resina Amberlite IRA-400Cl.

4.4.1. Resina Streamline Q XL

A resina Streamline Q XL é do tipo aniônico forte. O seu grupo de carga é de trimetilamina ($-N^+(CH_3)_3$) é composta de sefarose com 6% de fortes ligações cruzadas agarose contém em seu núcleo um cristalino de quartzo.

Foram realizados dois experimentos em colunas de leito fixo (modelo C 1,0/50) S1 e S2. Os experimentos foram realizados com 20 cm de leito preenchido com resina, vazão de alimentação $6 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, temperatura de 20° C , com caldo pré-tratado com membrana ultrafiltração de 3 kDa e pH inicial de 6,2. A eluição foi feita com uma solução de NaCl 5% (p/v). As amostras foram coletadas em frações de 10 mL e analisadas em CLAE. A Figura 4.14 e Figura 4.15 mostram os resultados dos experimentos S1 e S2.

A partir da Figura 4.14 pode se observar que a saturação da resina com AC ocorreu a partir de 22 min (com $C/C_0 \cong 0,01$) sendo que neste ensaio ocorreu um arraste do AC pelo caldo, visto que C/C_0 atinge valor próximo a 2,0, retornando ao valor de saturação. Não é observado dessorção do AC com lavagem da coluna com a água deionizada, indicando que o AC permanece eletronicamente adsorvido nos sítios da resina. As frações coletadas após a eluição apresentam fatores de concentração superiores a 3. O experimento S2 se diferencia do anterior, em relação ao volume de caldo alimentado na coluna. Conforme pode ser observado pelos resultados apresentados na Figura 4.15, aos 7 minutos iniciou-se a lavagem da coluna com água e não aos 40 como no experimento anterior, esta simples alteração no procedimento pode promover diferentes resultados quanto ao processo de purificação em si.

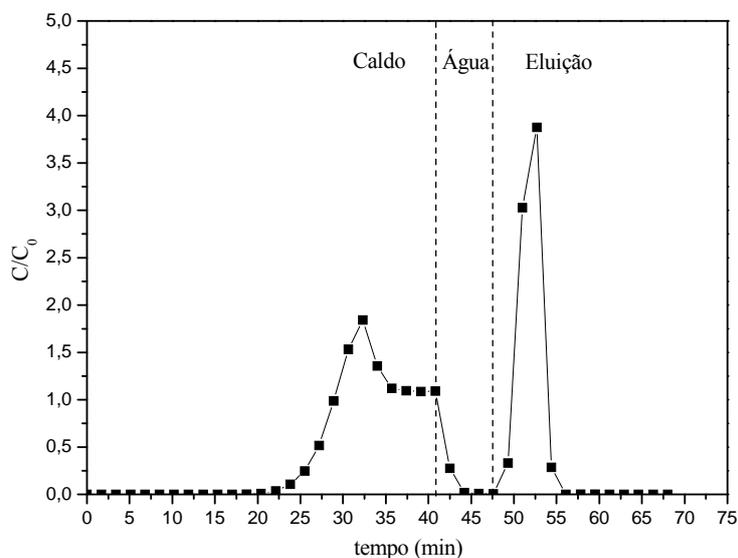


Figura 4.14. Experimento S1 em coluna de leito fixo com resina Streamline Q XL, a temperatura de 20° C, pH 6,2 e $C_{AC, amostra} = 737 \text{ mg.L}^{-1}$.

Com relação aos contaminantes, estes são adsorvidos pelos sítios da resina conforme representados nos primeiros 5 minutos de operação, sendo que a completa saturação da coluna em relação aos contaminantes ocorre em 10 minutos, isto é, a saturação por contaminantes é muito anterior à do AC, indicando que parte deles tem ainda mais afinidade pela resina, o que certamente, favorecerá o processo de purificação. Por outro lado, uma quantidade de contaminantes é eluída conjuntamente com o AC, este resultado indica necessidade de se operar à etapa de eluição através de gradientes e não de um único pulso. Ainda, com relação à Figura 4.15, nela é mostrado que o fator de purificação (FP) foi acima de 2. Os resultados nos experimentos S1 e S2 demonstram a viabilidade da resina Streamline Q XL em concentrar e purificar o AC. Sendo que esta resina pode ser utilizada na re-extração do AC da fase de topo do SDFA.

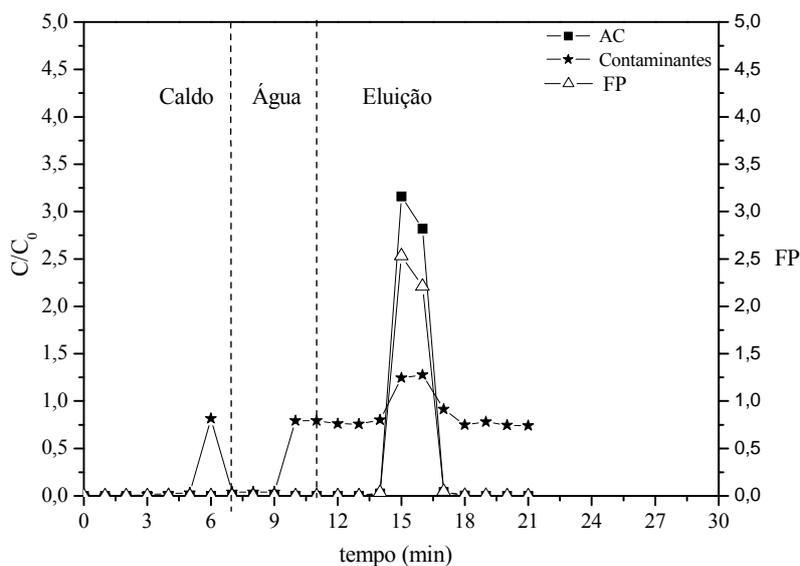


Figura 4.15. Experimento S2 em coluna de leito fixo com resina Streamline Q XL, a temperatura de 20° C, pH 6,2 e $C_{AC, amostra} = 667 \text{ mg.L}^{-1}$.

4.4.2. Estudo da influência da filtração por membranas no processo de purificação do ácido clavulânico por troca iônica

Após avaliação da resina Streamline Q XL, cujos resultados obtidos demonstram a viabilidade de sua aplicação na purificação e na concentração do AC. Foram realizados experimentos com caldos pré-tratados com membranas de diferentes tamanhos de poros no intuito de avaliar a influência do pré-tratamento na cromatografia de troca iônica em leito fixo utilizando a resina Streamline Q XL.

Na primeira etapa logo após o término da fermentação foram utilizadas duas membranas MF de 0,1 μm e 0,2 μm para retiradas das células. Os experimentos foram realizados em coluna de leito fixo (modelo XK 16 16/40) com 40 cm de leito preenchido com resina, vazão de alimentação 5,6 mL.min^{-1} , temperatura de 20° C e pH inicial de 6,2. A eluição foi feita com uma solução de forma linear tipo rampa. As amostras foram coletadas em frações de 10 mL e analisadas em CLAE. Nas Figuras 4.16 e 4.17 mostram os resultados das cromatografias obtidas com os caldos pré-tratados com as membranas MF 0,1 μm e 0,2 μm , respectivamente.

O pré-tratamento do caldo após a fermentação com as membranas MF forneceram filtrados totalmente livres de células em ambas as membranas. Analisando-se os resultados apresentados na Tabela 4.11 e nas Figuras de 4.16 e 4.17, pode-se verificar que ambas as membranas fornecem filtrados cujos efeitos são próximos quando submetidos à cromatografia de troca iônica com a resina Streamline Q XL. Os resultados para fator de concentração obtidos foram próximos a 5 e 2, para o AC e contaminantes, respectivamente. Além disso, os fatores de purificação, pH e rendimento também resultaram em valores muito próximos. Apesar de que, a eluição foi realizada de forma linear tipo rampa o pico de contaminante ocorreu no mesmo tempo que o pico de AC. Indicando que a os principais contaminantes são eluídos juntamente com o AC.

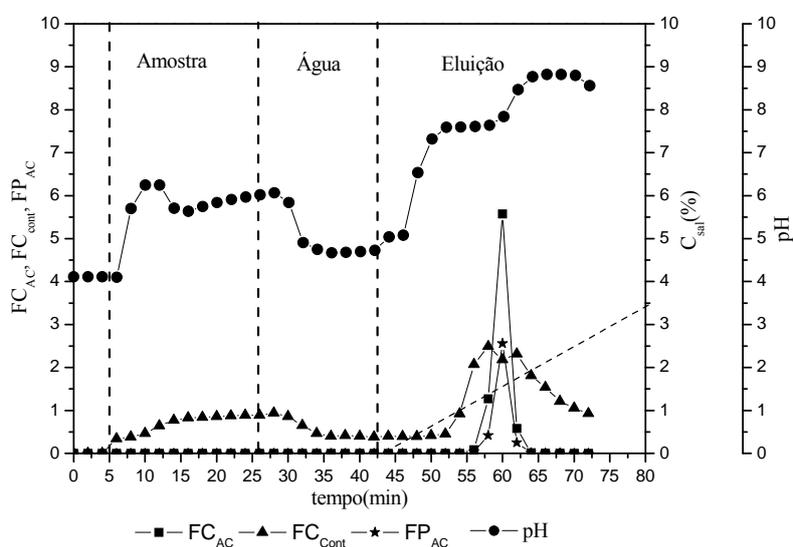


Figura 4.16. Evolução da cromatografia do AC utilizando do caldo pré-tratado com a membrana de MF de 0,2 μ m em coluna de leito fixo preenchida com resina Streamline Q XL, a temperatura de 20° C.

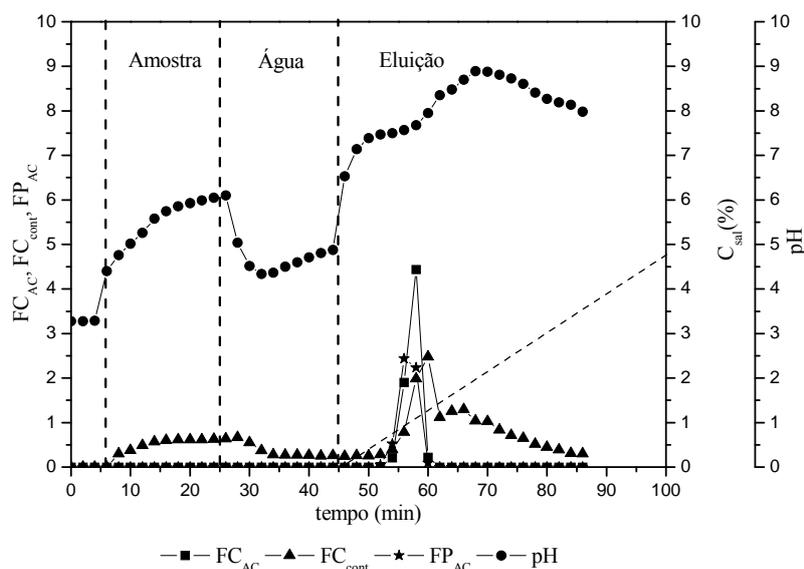


Figura 4.17. Evolução da cromatografia do AC utilizando caldo pré-tratado com a membrana de MF de 0,1 μm em coluna de leito fixo preenchida com resina Streamline Q XL, a temperatura de 20° C.

As Figuras 4.18 e 4.19 representam os resultados cromatográficos dos filtrados provenientes da membrana de MF com 0,2 μm tamanho de poro e pré-tratados com membranas UF de 50 e 3 kDa, respectivamente. Os resultados das cromatografias obtidos para ambos os filtrados provenientes das membranas de UF de 50 e 3 kDa demonstraram que uma parte da fração dos contaminantes contida no filtrado da MF fica retida na membrana de UF. Sendo assim, os filtrados das membranas de UF têm efeitos semelhantes no resultados da cromatografia de troca iônica com a resina Streamline Q XL (Tabela 4.11). A eluição por gradiente linear demonstrou um deslocamento da fração de maior fator de concentração de contaminantes em relação à fração de maior fator de concentração de AC.

Outro fato importante a salientar é a baixa degradação (D_{AC}) e o alto rendimento do AC (R_{AC}) durante a etapa cromatográfica com a resina Streamline Q XL, independente da origem do filtrado, como pode se observado na Tabela 4.11.

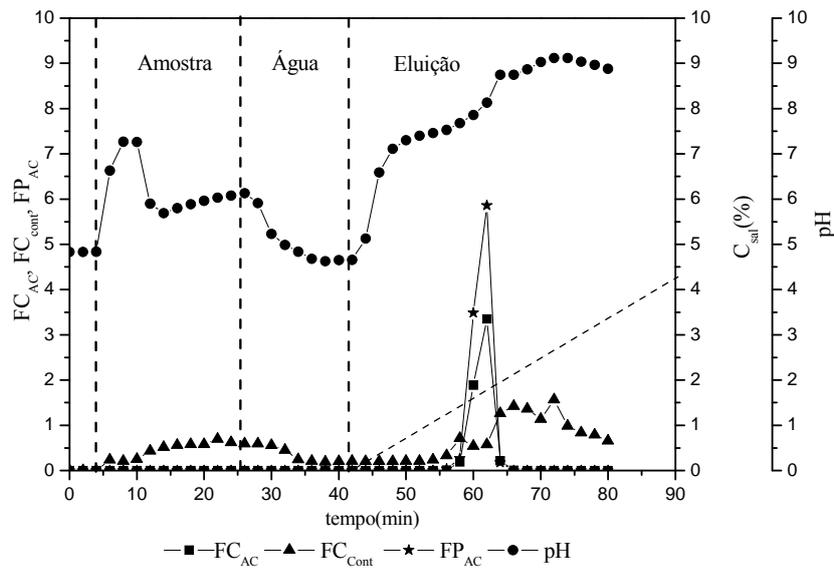


Figura 4.18. Evolução da cromatografia do AC utilizando caldo pré-tratado com a membrana de UF de 50 kDa em coluna de leito fixo preenchida com resina Streamline Q XL, a temperatura de 20° C.

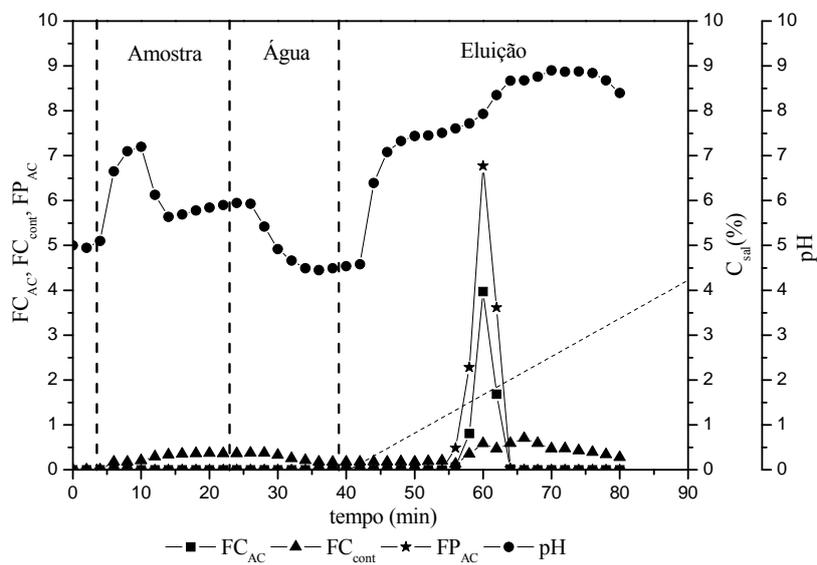


Figura 4.19. Evolução da cromatografia do AC utilizando caldo pré-tratado com a membrana de UF de 3 kDa em coluna de leito fixo preenchida com resina Streamline Q XL, a temperatura de 20° C.

Tabela 4.11. Resultados da evolução da cromatografia utilizando caldo pré-tratado com membranas de MF e UF em coluna de leito fixo preenchida com resina Streamline Q XL, a temperatura de 20° C.

Membrana	Fluxo (mL.min ⁻¹)	V_{resina} (cm ³)	$C_{AC, amostra}$ (mg.L ⁻¹)	FC_{AC} (-)	FC_{cont} (-)	FP (-)	R_{AC} (%)	D_{AC} (%)
0,2 µm	5,6	60,3	1026,0	5,58	2,18	2,55	100	0,0
0,1 µm	5,6	60,3	966,3	4,43	1,98	2,46	98,5	1,5
50 kDa	5,6	60,3	994,8	3,35	0,54	5,86	92,0	8,0
3 kDa	5,6	60,3	1068,5	3,97	0,59	6,77	97,2	2,8

4.4.3. Estudo da influência da MF e UF na cinética de adsorção do ácido clavulânico sobre a resina Streamline QXL

Nesta etapa foi analisada a influência do pré-tratamento do caldo por membranas de diferentes tamanho de poros na cinética de adsorção e dessorção do AC em um tanque agitado. Neste estudo foram utilizados 12,5 g de resina em base úmida da resina Streamline Q XL, agitado a 200 rpm e 100 mL de caldo pré-tratado com membrana de microfiltração de 0,1 e 0,2 µm e caldos pré-tratados com microfiltração de (0,2 µm) e na sequência ultrafiltrados em membranas de 3 e 50 kDa. Os resultados experimentais das curvas cinéticas de adsorção e dessorção para o ácido clavulânico, obtidas com caldos encontram-se apresentados na Figura 4.20a e 4.20b, respectivamente.

De acordo com os resultados obtidos é possível verificar que para os caldos ultrafiltrados há um aumento significativo da quantidade adsorvida quando comparados com os caldos microfiltrados (Figura 4.20a). Para o caldo filtrado por membrana de 3 kDa, a quantidade adsorvida observada foi um pouco menor que para os caldos feitos passar por membranas de 50 kDa, isso possivelmente ocorre por haver adsorção de contaminantes (maiores que 3 kDa e menores que 50 kDa, por exemplo, peptídeos eletrostaticamente carregados), e de AC que pode sofrer alguma interação de cargas com estes contaminantes, induzindo à interpretação e conclusão de que o AC presente nos caldos filtrados em 50 kDa possam ser melhor adsorvidos do que aqueles filtrados em 3 kDa, no entanto a qualidade do produto obtido pode ser de menor pureza. Essa hipótese é corroborada através das análises de contaminantes durante o processo de adsorção e dessorção.

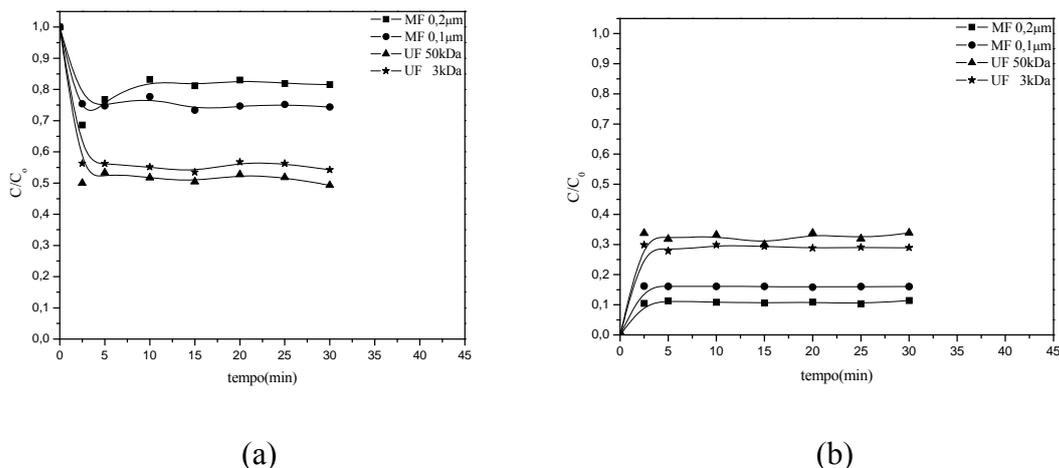


Figura 4.20. Resultados dos estudos cinéticos do AC presente em caldos pré-tratados com membranas de MF e UF em resina Streamline Q XL, a temperatura de 20° C: a) adsorção; b) eluição.

A Figura 4.21a e 4.21b apresentam os resultados obtidos em relação à adsorção e eluição dos contaminantes do caldo, respectivamente. É possível verificar, a partir dos resultados apresentados na Figura 4.21a, que a maior quantidade de contaminantes, quantificados no comprimento de onda de 280 nm adsorvidos ocorreu para as soluções ultrafiltradas em membranas de 50 kDa. Cabe lembrar que esta adsorção é de troca aniônica e alguns contaminantes aniônicos que não são lidos a 280 nm, interferem na adsorção de AC.

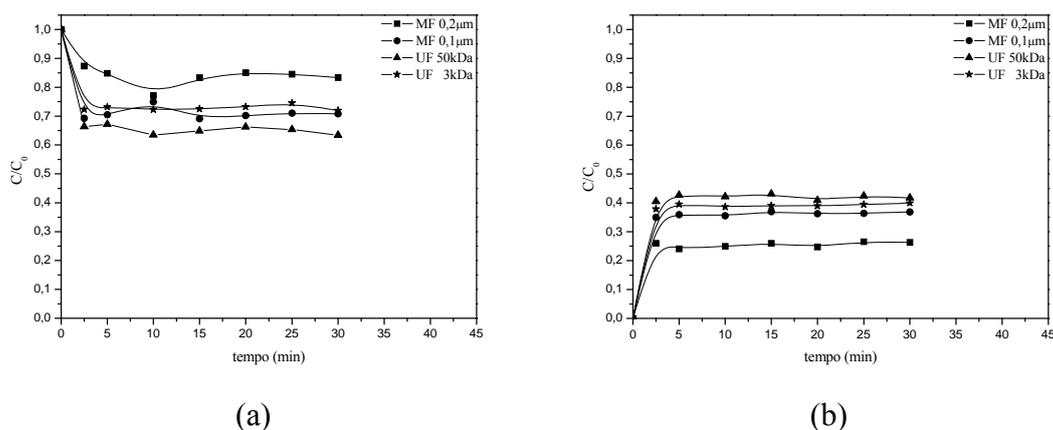


Figura 4.21. Resultados dos estudos cinéticos dos contaminantes presente em caldos contendo AC pré-tratados com membranas de MF e UF na resina Streamline Q XL, a temperatura de 20° C; a) adsorção, b) eluição.

4.4.4. Isotermas de equilíbrio do AC em relação à resina Streamline Q XL

Foram realizados experimentos de equilíbrio de adsorção de AC sobre a resina Streamline Q XL, com caldos microfiltrados e ultrafiltrados, além de uma solução de AC obtida a partir do produto farmacêutico Clavulin[®]. Os experimentos nesta etapa para determinar as curvas de equilíbrio foram realizados em duplicatas. A Figura 4.22 e 4.23 representa o equilíbrio de adsorção para um caldo filtrado em uma membrana de microfiltração de 0,2 e 0,1 μm de tamanho de poro, respectivamente.

De acordo com o resultado apresentado na Figura 4.22, a isoterma com caldo microfiltrado com a membrana de MF de 0,2 μm , é possível verificar que, na faixa de concentração em que se realizou o estudo, não se tem uma adsorção favorável, visto que a quantidade adsorvida vai aumentando exponencialmente à medida que se aumenta a concentração em solução. Este resultado sugere que a adsorção ocorre em multicamadas, tanto do AC como de outros compostos presentes na solução e a maior presença de moléculas de AC aumentaria a probabilidade de adsorção deste pelos sítios da resina.

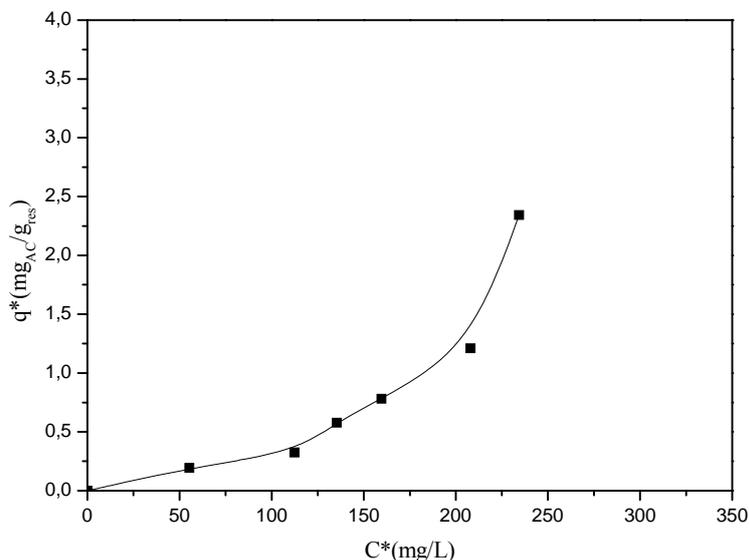


Figura 4.22. Isoterma de equilíbrio de adsorção do ácido clavulânico presente em caldo pré-tratado com membrana de MF de 0,2 μm , a temperatura de 20° C.

A Figura 4.23 apresenta o resultado dos estudos de equilíbrio com caldo microfiltrado em membrana de tamanho de poro de 0,1 μm , fornecendo, portanto um

caldo com uma quantidade menor de impurezas de alto peso molecular, quando comparado com o resultado obtido por microfiltração com membrana de $0,2 \mu\text{m}$. Este experimento foi possível ser realizado com uma concentração de AC de até 800 mg/L enquanto que o resultado da microfiltração com membrana de $0,2 \mu\text{m}$ foi de até 200 mg/L . Nota-se, de acordo com esses resultados, que o comportamento inicial da isoterma é muito distinto do anterior, onde neste caso não é verificada uma tendência exponencial no início da isoterma. Isso mostra que a microfiltração com $0,1 \mu\text{m}$ de tamanho de poro remove contaminantes que são preferencialmente adsorvidos pela resina, aumentando assim a quantidade de AC adsorvido. No entanto, à medida que se tem uma concentração de AC maior no caldo, a quantidade adsorvida diminui muito. Este fenômeno reforça que a adsorção pode estar ocorrendo em multicamadas, incluindo-se com contaminantes iônicos, e que a princípio poderia trazer um resultado positivo, visto que em um mesmo sítio mais de uma molécula pode estar se ligando, no entanto, estas ligações sobre-camadas são enfraquecidas pela interação das moléculas adjacentes enfraquecendo a adsorção do AC sobre a superfície da resina, o que causaria uma diminuição da quantidade efetivamente adsorvida.

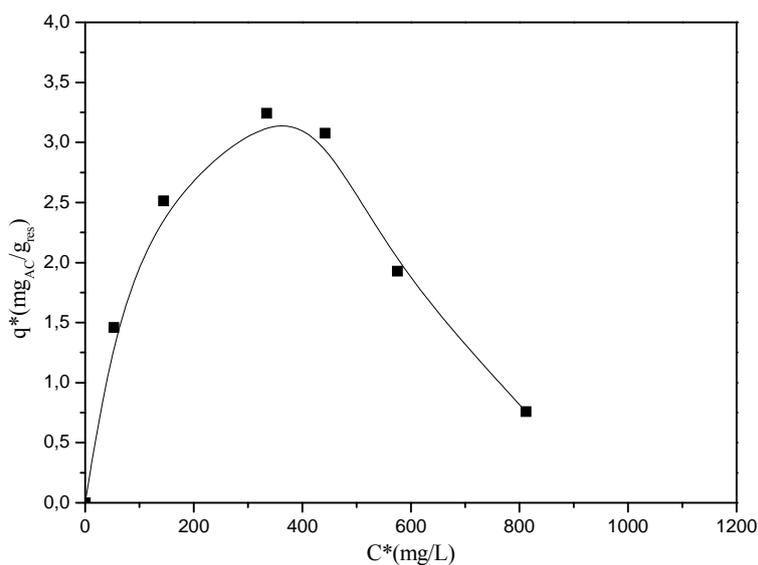


Figura 4.23. Isoterma de equilíbrio de adsorção do ácido clavulânico presente em caldo pré-tratado com membrana de MF de $0,1 \mu\text{m}$, a temperatura de 20°C .

Os resultados de equilíbrio obtidos para adsorção em caldos ultrafiltrados com membranas de 50 e 3 kDa encontram-se apresentados na Figura 4.24 e 4.25, respectivamente. A determinação da isoterma do AC com caldo pré-tratado com a membrana de UF de 50 kDa foi possível ser realizado com caldo com concentração de até 800 mg/L, tal como o estudo realizado para caldo microfiltrado em membrana de 0,1 μm . De acordo com este resultado é possível verificar que há reprodutibilidade em relação ao resultado obtido com a microfiltração de 0,1 μm (Figura 4.24 e 4.25). Neste caso a partir de 600 mg/L de AC em solução é que se verifica uma diminuição da quantidade adsorvida. Isto mostra que à medida que se diminuem os contaminantes da solução há menor interferência eletrostática entre os sítios da resina e o AC.

Como pode se observado na Figura 4.25, o estudo não permitiu mostrar a saturação da resina, em vista da concentração de AC em solução ser baixa em comparação com os resultados obtidos com MF de 0,1 μm e 50 kDa. Diferentemente do resultado obtido com caldo filtrado na membrana de MF de 0,2 μm , esta solução mostra que a isoterma é favorável e por se estar trabalhando na faixa de concentração de equilíbrio muito baixa, ela se comporta de acordo com a Lei de Henry para soluções diluídas (Figura 4.25). Ainda assim, para esta solução que a rigor está mais pura que a UF com membrana de 50 kDa, a maior quantidade adsorvida foi inferior ao caso anterior, onde a 400 mg/L de AC em solução foi possível adsorver cerca de 3,25 mg de AC por grama de resina, enquanto que com o caldo filtrado na membrana de UF em 3 kDa esta capacidade foi de 2,25 mg de AC por grama de resina.

Este resultado vem de encontro com os resultados obtidos no estudo cinético, em que foi discutido que alguns contaminantes iônicos interferem na adsorção de AC. Assim, é possível que alguns contaminantes com tamanho entre 3 e 50 kDa adsorvam o ácido clavulânico e por sua vez sejam adsorvidos pelos sítios da resina.

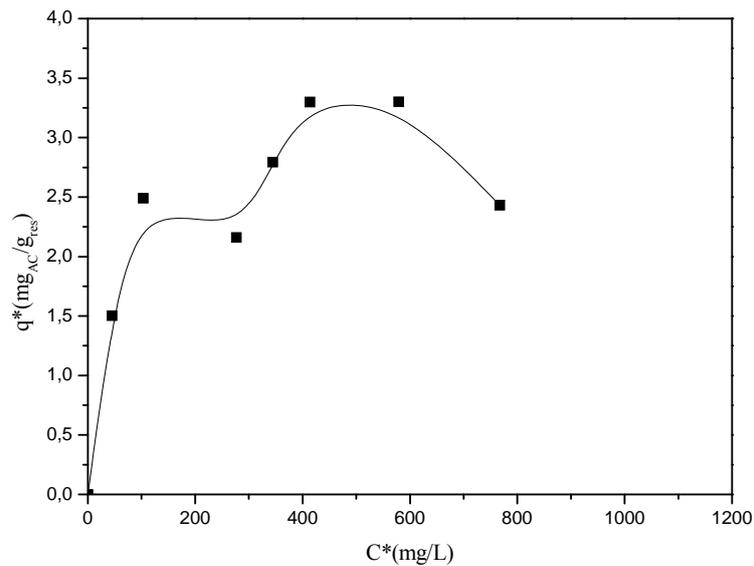


Figura 4.24. Isoterma de equilíbrio de adsorção do ácido clavulânico presente em caldo pré-tratado com membrana de UF de 50 kDa, a temperatura de 20° C.

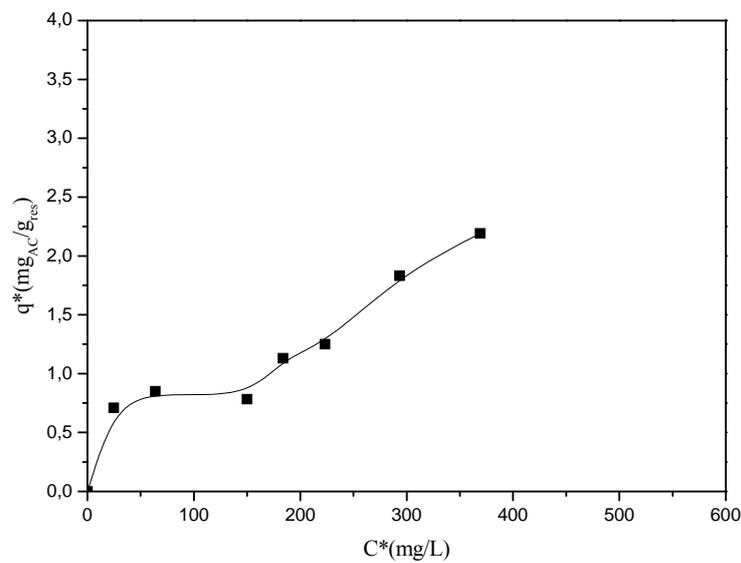


Figura 4.25. Isoterma de equilíbrio de adsorção do ácido clavulânico presente em caldo pré-tratado com membrana de UF de 3 kDa, a temperatura de 20° C.

Por fim foi realizado um experimento de equilíbrio com AC obtido a partir do produto farmacêutico Clavulin[®], portanto um composto já purificado. De acordo com o resultado de equilíbrio apresentado na Figura 4.26, é possível verificar que a adsorção

do AC proveniente do produto Clavulin[®] ocorre e que há uma máxima capacidade oferecida pela resina. Este resultado mostra que a ausência de muitos interferentes, encontrados em caldos de cultivos, aumenta a quantidade de AC adsorvido pela resina.

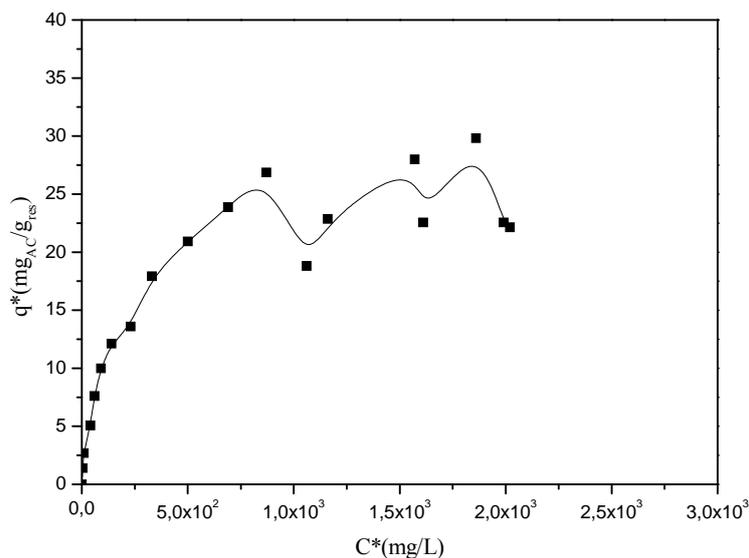


Figura 4.26. Isoterma de Equilíbrio de adsorção do AC obtido a partir do produto farmacêutico Clavulin[®], a temperatura de 20° C.

A partir destes resultados foram utilizados os modelos de Langmuir, Freundlich e Elovich, respectivamente, para verificar qual deles que melhor descreveria os fenômenos observados experimentalmente. Cada um dos parâmetros dos modelos propostos foi obtido por ajuste não-linear e os resultados estão apresentados na Tabela 4.12. De acordo com estes resultados é possível verificar que o modelo de Langmuir não representa o equilíbrio de adsorção para o AC obtido a partir dos caldos de cultivo nas diferentes situações de filtração. O modelo de Freundlich representa bem os resultados obtidos para o caldo microfiltrado com membrana de 0,2 μm , reforçando que ocorre uma adsorção não favorável para esta situação. O modelo de Elovich foi o que melhor representou as isotermas obtidas com exceção à isoterma para o filtrado da membrana de MF de 0,2 μm . Este modelo prevê uma adsorção em multicamadas, com diminuição da energia de adsorção com o aumento destas camadas. Isto explicaria a queda da quantidade adsorvida com o aumento da concentração de AC em solução.

A partir deste conjunto de experimentos pode concluir a possibilidade de utilizar a resina Streamline Q XL na re-extração do AC presente na fase PEG. Assim, esses resultados podem ser comparados com os resultados obtidos por BARBOZA; ALMEIDA; HOKKA (2002a) e ALMEIDA (2003) que apesar de terem verificado a viabilidade do uso da resina Amberlite IRA-400Cl, verificaram perdas de AC durante o processo. Na continuidade deste texto, serão apresentados os resultados da aplicação destas duas resinas na re-extração do AC da fase rica em PEG do SDFa, bem como os estudos cinéticos e de equilíbrio para estas soluções PEG e AC.

Tabela 4.12. Valores dos parâmetros dos modelos de isoterma utilizados para o equilíbrio de adsorção de AC sobre a resina Streamline QXL, a temperatura de 20° C.

Modelo Langmuir			
Membrana	q_m (mg _{AC} g _{res} ⁻¹)	K_D (mg.L ⁻¹)	R ² (-)
0,2µm	6,79x10 ¹⁵	1,018x10 ¹⁸	0,73
0,1µm	3,02	22,58	0,84
50kDa	3,08	37,53	0,87
3kDa	7,53	957,00	0,84
Clavulin®	27,17	166,17	0,94
Modelo de Freundlich			
Membrana	K_F (mg ^{1-(1/n)} .L ^{1/n} .g ⁻¹)	n (-)	R ² (-)
0,2µm	4,84x10 ⁻⁷	0,36	0,95
0,1µm	1,77	13,06	0,82
50kDa	1,31	8,41	0,81
3kDa	0,05	1,57	0,88
Clavulin®	2,26	3,26	0,89
Modelo de Elovich			
Membrana	q_m (mg _{AC} .g _{res} ⁻¹)	K_E (L.mg ⁻¹)	R ² (-)
0,2µm	0,0058	1,14	0,73
0,1µm	269,98	9,00x10 ⁻⁵	0,92
50kDa	321,74	5,00x10 ⁻⁵	0,92
3kDa	1246,16	4,92x10 ⁻⁵	0,84
Clavulin®	511,23	1,60x10 ⁻⁴	0,96

4.4.5. Re-extração do AC da fase de topo do SDFA em leito fixo com a resina Amberlite IRA-400Cl

No estudo preliminar da capacidade de re-extração do AC da fase de topo do SDFA em leito fixo com a resina Amberlite IRA-400Cl, foram realizados dois experimentos. No primeiro experimento o SDFA foi composto por PEG 6000 e fosfato realizado na coluna de leito fixo (modelo C 1,0/50), vazão de alimentação de $2 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, 20 cm de altura de coluna preenchida a temperatura de 22° C . No segundo experimento o SDFA foi composto por PEG 600 e fosfato e o processo foi realizado na coluna de leito fixo (modelo XK 16 16/40), vazão de alimentação de $6 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, 30 cm de altura de coluna preenchida a temperatura de 20° C . Para a eluição do AC da coluna foi utilizada uma solução 5% (p/v) de NaCl. Os resultados do SDFA para ambos os experimentos encontram-se apresentados na Tabela 4.13.

Tabela 4.13. Resultados experimentais obtidos da extração do AC por SDFA para re-extração do AC pela resina Amberlite IRA-400Cl, a temperatura $22 \pm 2^\circ \text{ C}$.

PEG	PEG/fosfato (% m/m)	$C_{AC, amostra}$ ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	$C_{AC, topo}$ ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	$C_{AC, fundo}$ ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	K (-)	Rendimento (%)		
						Topo	Fundo	Total
6000	10/15	578,0	270,4	116,9	2,3	51,0	35,0	86,0
600	15/15	513,0	113,9	22,3	5,1	76,0	14,0	90,0

A Figura 4.24 mostra o cromatograma da re-extração do AC da fase rica de PEG 6000. Pode se observar que o PEG 6000 foi concentrado no processo e que, durante a etapa de lavagem foi praticamente eliminado, salvo por dois pontos (35 e 57,5 min) em que apareceram picos revelando quantidades de PEG que ou foram adsorvidas pela resina, ou ficaram retidos nos interstícios do leito empacotado, devido à alta viscosidade da fase de topo deste sistema utilizado, próximo a $35 \text{ mPa}\cdot\text{s}$ (RAHBARISAKHT; TAGHIZADEH; ELIASSI, 2003). No entanto, a etapa de eluição mostra claramente que, mesmo após a retirada do PEG-6000, o AC ficou adsorvido na resina, o que prova que este foi separado do PEG-6000, apesar de não atingir fatores de concentração elevados durante o processo.

Durante o processo de eluição é obtido um baixo fator de concentração de AC como mostra a Figura 4.27. Este fato está relacionado à degradação que sofre o AC devido aos sítios ativos da resina, conforme já verificado em trabalhos anteriores de MAYER; ANSPANCH; DECKWER (1996 e 1997). No entanto, MAYER; ANSPANCH; DECKWER (1996) obtiveram um fator de concentração próximo a 2, o que não foi possível obter nesta etapa do trabalho, devido à presença de fosfato na fase de topo, o que diminui a capacidade de extração do AC.

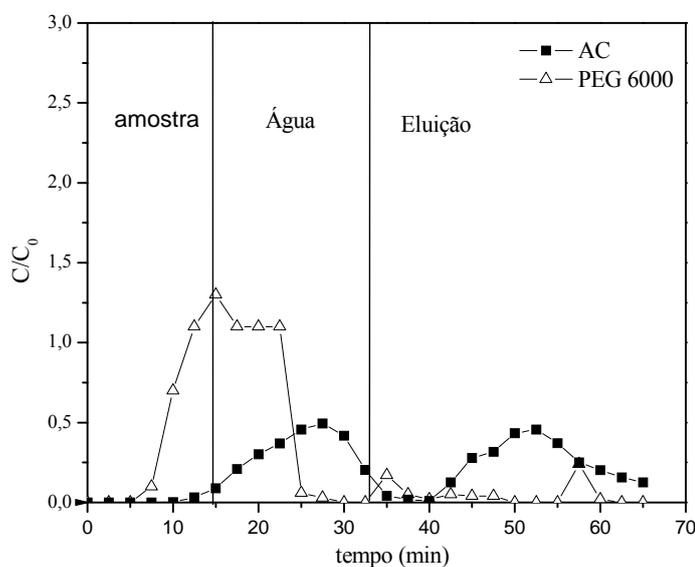


Figura 4.27. Re-extração de AC da fase de topo PEG 6000 com a resina Amberlite IRA-400Cl, a 20° C, pH 6,2 e $C_{AC, topo} = 270,4 \text{ mg.L}^{-1}$.

Na Figura 4.28 pode-se observar o cromatograma da re-extração do AC da fase rica em PEG 600. Durante os primeiros 5 minutos de coleta não se observa no efluente a presença do AC, sendo este o período de saturação da coluna. A partir deste tempo, observa-se no efluente o AC que não foi adsorvido. Devido a sua menor viscosidade (23,7 mPa.s) na fase de topo a passagem de água retira o excesso PEG 600 que ficou nos interstícios do leito empacotado, na qual se pode notar que sua concentração chega à zero após a lavagem. Mais uma vez, o PEG apresentou alto fator de concentração. Também se pode observar que o AC é separado do PEG-600 durante o procedimento experimental. Na Figura 4.28, a curva de ruptura não atinge o valor de C/C_0 de 1, em relação ao AC, como observado por MAYER; ANSPANCH; DECKWER (1996).

Deve-se à degradação do AC quando adsorvido nos sítios da resina Amberlite IRA-400Cl.

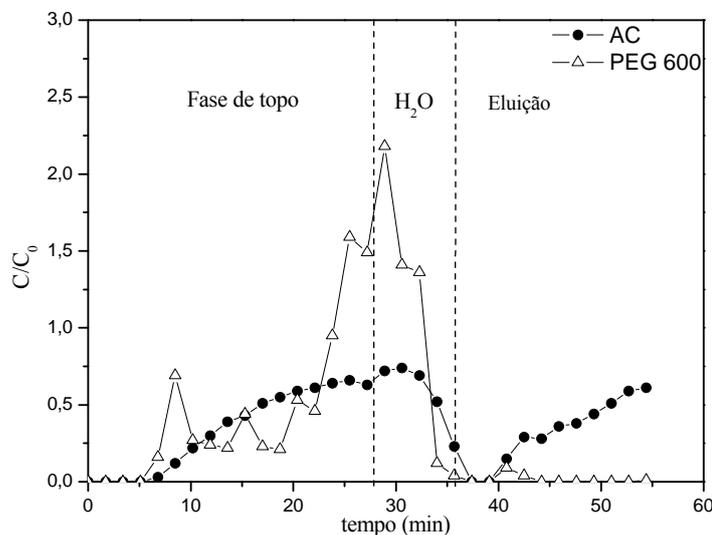


Figura 4.28. Re-extração de AC da fase de topo PEG 600 com a resina Amberlite IRA-400Cl, a 20° C, pH 6,2 e $C_{AC, topo} = 113,9 \text{ mg.L}^{-1}$.

4.4.6. Re-extração do AC da fase de topo do SDFa em leito fixo com a resina Streamline Q XL

Para resina Streamline Q XL foi realizado um ensaio com a fase de topo do PEG 600 em uma coluna de leito fixo (modelo XK 16 16/40) a temperatura de 20° C, vazão 6,0 mL.min⁻¹, 30 cm de leito preenchido e temperatura de 20° C. Para eluição AC utilizou-se uma solução de 1% (p/v) de NaCl. Na Figura 4.29 apresenta os resultados obtidos para a re-extração do AC. Nas condições de operação realizada, a resina Streamline Q XL não foi capaz de re-extrair o AC da fase rica em PEG. No entanto, durante os primeiros 10 minutos de operação, ocorreu adsorção do AC, indicando a baixa adsorção do AC pela resina, porém após a saturação da coluna ocorre um arraste do AC, visto que C/C_0 atinge um valor próximo a 1,6 retornando um valor $C/C_0 = 1,1$ acima do valor de saturação da coluna, isto é, $C/C_0 = 1,0$, como mostra a Figura 4.29. Esses resultados diferiram muito dos obtidos para esta resina com solução de AC ultrafiltrado. Durante a lavagem não é observado dessorção do AC com lavagem da coluna com a água deionizada. Também as

frações coletadas após a eluição não indicam a presença de AC, somente pelo ponto 53 min apresenta $C/C_0 = 0,1$ (Figura 4.29). Estes resultados indicam que a interferência do fosfato presente na fase rica em PEG foi muito maior que para a resina Amberlite IRA-400Cl.

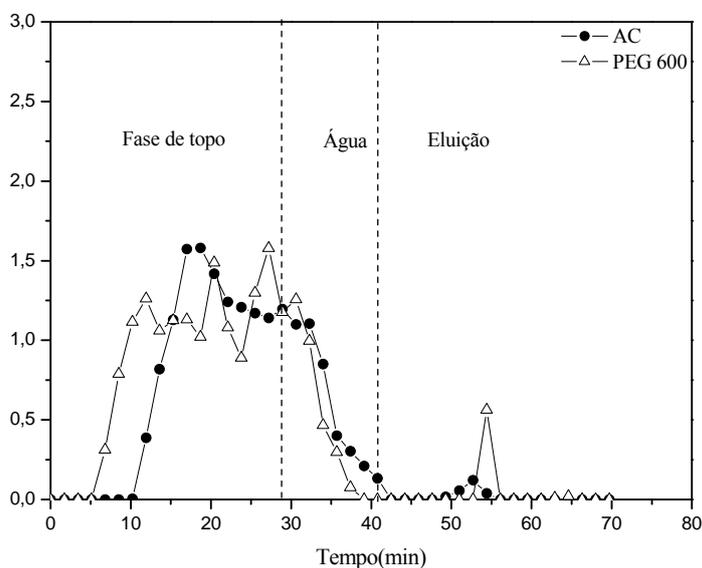


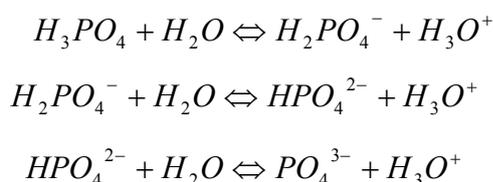
Figura 4.29. Re-extração de AC da fase de topo PEG 600 com a resina Streamline Q XL, a 20° C, pH 6,2 e $C_{AC, topo} = 113,9 \text{ mg.L}^{-1}$.

4.4.7. Análise do fósforo e pH durante a re-extração do AC por adsorção

No S DFA após a formação das duas fases, que estão em equilíbrio, tem-se que ter em conta as composições das fases de fundo e topo. O diagrama de fase que descreve a composição das fases é descrito por ALBERTSSON (1986). Para o S DFA composto de PEG 600 concentrações de 15% (m/m) de PEG e 17% (m/m) fosfato, no equilíbrio a fase de topo é composta de 40,3% de PEG, 3,3% de sais de fosfato e 56,4% de água. Desta forma prevê-se que o fosfato presente na fase topo vai influir na adsorção por troca aniônica. A avaliação desta influência é importante, pois definirá a necessidade da retirada do sal por alguma técnica, o que pode inviabilizar o processo de re-extração proposto.

O primeiro experimento realizado para acompanhar o fosfato presente na fase topo durante a re-extração foi feito utilizando-se a resina Amberlite IRA-400Cl. Na Figura 4.30 pode-se observar os resultados experimentais obtidos, no qual se verifica comportamento da concentração do fosfato nas frações coletadas durante a re-extração

do AC da fase PEG 600 pela resina Amberlite IRA-400Cl. Nota-se a adsorção do fosfato na resina juntamente com a de AC. Após a lavagem com água deionizada observa-se a eluição do fosfato em conjunto com AC. A solução tampão fosfato de potássio pH 6,2 é formada pela mistura de dois sais K_2HPO_4 e KH_2PO_4 . Considerando que ambos os sais dissociam-se completamente em água as seguintes reações químicas:



Normalmente íons com carga elevada são ligados mais fortemente ao trocador que os íons de baixa carga, nas mesmas concentrações (SPADARO, 2007a). Assim, por estar em maior quantidade, o sal de fosfato e os ânions de fosfatos por terem carga mais elevada que o ânion clavulanato (AC^-), estes são preferencialmente adsorvidos pelo sítio da resina levando os menores valores de rendimento. Pode-se concluir que os ânions da dissociação dos sais de fosfatos interferem diretamente na adsorção do AC nas resinas Amberlite IRA-400Cl e Streamline Q XL.

O pH das frações coletadas para resina Amberlite IRA-400Cl durante processo variou entre 7,2 e 5,5, nos estudos de adsorção e dessorção dos ânions de fosfatos (Figura 4.30). Considerando que o pH no micro ambiente de um trocador de íons não é o mesmo da solução utilizada. Devido ao efeito Donnan que pode repelir ou atrair prótons na superfície da matriz. De maneira geral pH na matriz é usualmente em torno de uma unidade maior do que solução para uma resina aniônica (SCOPES, 1982). Assim, é possível creditar a degradação do AC em contato com a superfície da resina Amberlite IRA-400Cl, pois, o pH da solução durante a operação do processo é próximo a 7, logo no micro ambiente da resina Amberlite IRA-400Cl o pH deverá estar em torno de 8, que é um valor onde a velocidade de degradação do AC é alta (BERSANETTI *et al.*, 2005). Com isso, a curva de ruptura não atinge o valor de $C/C_0 = 1,0$ (BARBOZA; ALMEIDA; HOKKA, 2002b).

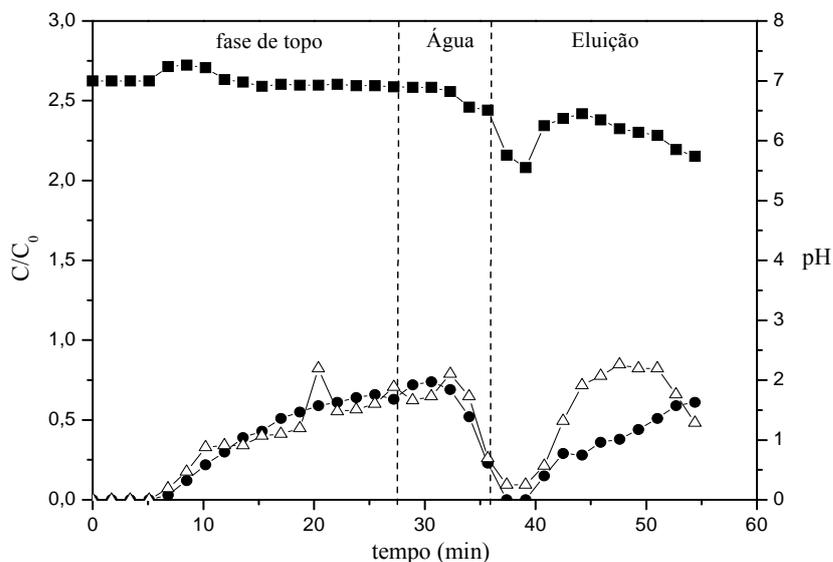


Figura 4.30. Evolução do pH e da adsorção do fósforo na re-extração do AC da fase PEG-600 pela resina Amberlite IRA-400Cl, a temperatura de 20° C: AC (●), fósforo (Δ), pH (■).

Na Figura 4.31 pode se observar que os íons de fosfato interferem diretamente na adsorção do AC pela resina Streamline Q XL, uma vez que, a saturação da coluna pelos íons fosfato ocorre com 15 min de processo, enquanto que, a saturação AC ocorre em 10 min. Cabe ressaltar que se considerou como saturação o ponto de ruptura, que ocorre no tempo onde C/C_0 é de aproximadamente 0,05.

Com isso os sítios ativos da resina foram ocupados preferencialmente pelos íons fosfato, não permitindo a separação do AC e do PEG. Durante a coleta das frações de lavagem foi observada uma pequena dessorção dos íons de fosfato atingindo valores de C/C_0 próximo a 0,4. Não foi observada nas frações coletadas durante a eluição a dessorção dos íons fosfatos utilizando a solução de NaCl de 1% (m/v), salvo pelo ponto 54 min que apresentou uma $C/C_0 = 0,2$, como pode se observado na Figura 4.31. A variação do pH foi próxima 6,6 durante a saturação da coluna, considerando o mesmo efeito Donnan para resina Streamline Q XL, o pH no micro ambiente da resina é em torno de 7,6, no entanto, não é observado a mesma degradação pelos sítios ativos da resina em relação ao observado na resina Amberlite IRA-400Cl (Figura 4.31).

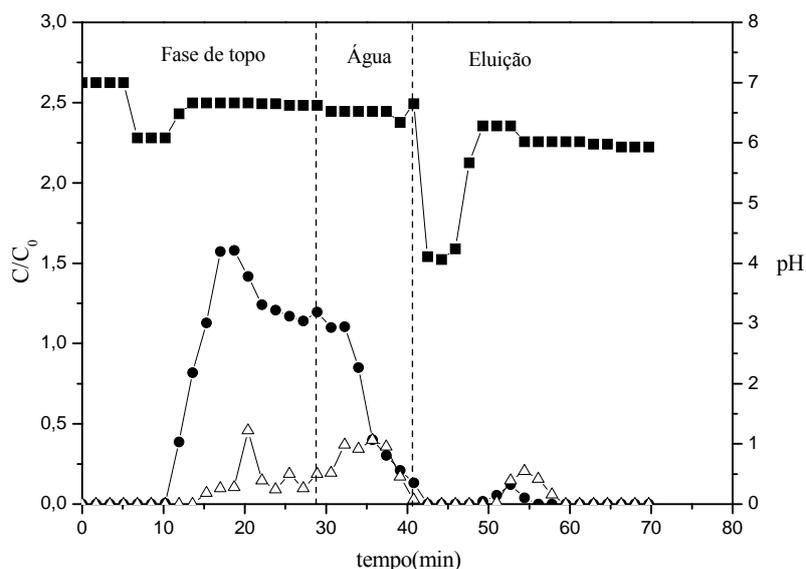


Figura 4.31. Evolução do pH e adsorção do fósforo na re-extração do AC da fase PEG-600 pela resina Streamline Q XL, a temperatura de 20° C: AC (●), fósforo (△), pH (■).

4.5. Adsorção e dessorção na re-extração do AC da fase topo do SDFa

A partir dos resultados apresentados no Item 4.4.5 foi possível constatar que a resina Amberlite IRA-400Cl não permite concentrar o AC, no entanto é possível isolar o AC da fase PEG, isto pode ser verificado pelos valores obtidos dos fatores de concentração do AC e PEG. Para resina Streamline Q XL observa-se que a resina não foi capaz de re-extrair o AC da fase rica em PEG do SDFa. Porém, o fosfato que compõem a fase de topo influenciou adsorção do AC para ambas as resinas, como pode ser observado no item 4.4.6. Na etapa seguinte foi analisada a influência da temperatura na re-extração do AC do SDFa constituído por 15% (m/m) de PEG 600 e 17% (m/m) pela resina Amberlite IRA 400-Cl em coluna de leito fixo e tanque agitado.

4.5.1. Influência da temperatura na re-extração do AC da fase de topo do S DFA utilizando a resina Amberlite IRA-400Cl

Os experimentos em colunas de leito fixo foram realizados na coluna XK 16 16/40, preenchida com 30 cm de altura de resina, vazão de $6 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ e a eluição foi feita com solução de NaCl 5% (m/v). Os resultados da extração do AC pelo S DFA realizado na temperatura de $22 \pm 2^\circ \text{ C}$ e pH 6,2, para obter a fase de topo para os experimentos de re-extração do AC estão representados na Tabela 4.14.

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 4.14, é possível verificar que o rendimento total do S DFA ficou entre 90 e 100% indicando uma baixa degradação do AC pelo S DFA, como observado por VIDEIRA; AIRES-BARROS (1994) utilizando o sal de AC. Na Tabela 4.14 observa-se que a concentração inicial do AC da amostra não apresentou influência no coeficiente de partição e rendimento.

Tabela 4.14. Resultados experimentais obtidos da extração do AC por S DFA, na temperatura de $22 \pm 2^\circ \text{ C}$ e pH 6,2, e para re-extração do AC pela resina Amberlite IRA-400Cl em coluna de leito fixo para avaliar influência da temperatura.

$T^{(a)}$ ($^\circ \text{ C}$)	$C_{AC, amostra}$ ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	$C_{AC, topo}$ ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	$C_{AC, fundo}$ ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	K (-)	Rendimento (%)		
					Topo	Fundo	Total
30	455,5	132,8	26,0	5,1	86,0	14,0	100
20	712,5	150,8	25,9	5,8	86,0	8,0	94,0
10	435,4	101,3	29,5	3,4	79,0	20,0	99,0

a) Temperatura na qual foi mantida a coluna de leito fixo.

A Figura 4.32 mostra que há um pequeno efeito da temperatura na saturação da coluna de leito fixo para a adsorção do AC. O tempo de ruptura para ambos os experimentos foi próximo a 7 minutos de corrida. A elevação da temperatura de 20° C para 30° C favorece a difusão do PEG e, portanto do AC na resina, por outro lado esta elevação da temperatura aumenta a velocidade de degradação nos sítios e no seio do fluido. Com a temperatura de 10° C esperava-se que a saturação fosse completa tendo em vista uma menor velocidade de degradação do AC no seio do fluido e pelos sítios da resina. No entanto, nesta temperatura os efeitos de resistência à transferência de massa se fazem mais presentes, isto é, ocorre uma diminuição da difusividade efetiva e um

aumento na resistência à transferência de massa externa, que devem afetar o processo de saturação. A operação na temperatura de 20° C foi a que forneceu melhor resultado, visto que nesta temperatura a velocidade de degradação do AC é menor do que a 30° C e ainda não deve afetar significativamente os coeficientes de transferência de massa, não acarretando atraso no processo de adsorção, como pôde ter ocorrido na temperatura de 10° C. Em ambas as temperaturas não houve saturação completa da coluna devido à degradação do AC pela resina, como já observada na literatura (MAYER; ANSPANCH; DECKWER, 1996).

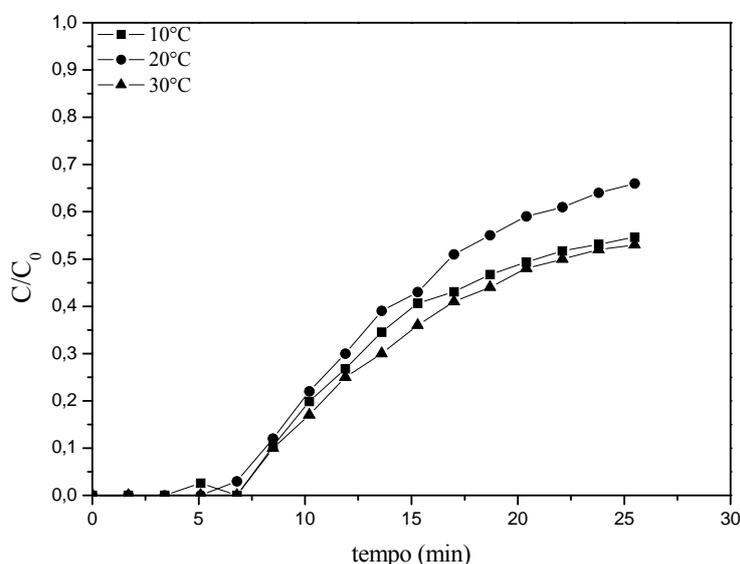


Figura 4.32. Curvas de saturação do AC presente na fase rica em PEG 600 na resina Amberlite IRA-400Cl no processo de coluna de leito fixo para diferentes temperaturas.

Na Figura 4.33 pode ser observado que o aumento da temperatura na eluição permite uma antecipação do pico de eluição. Isso ocorreu para as temperaturas de 20° e 30° C, cujo pico de eluição saiu em torno de 15 min. O experimento realizado a 20° C foi o que permitiu maior concentração de AC, visto que durante a etapa de adsorção foi o que pôde captar uma maior quantidade de AC por minimização da degradação. A eluição a 10° C teve um atraso de tempo, em virtude das diminuições dos coeficientes de transferência de massa.

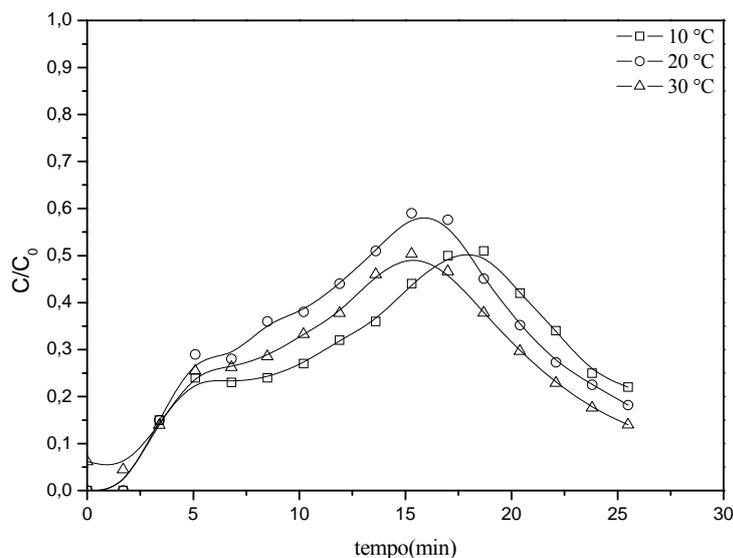


Figura 4.33. Curvas de eluição do AC adsorvido na resina Amberlite IRA-400Cl no processo de coluna de leito fixo para diferentes temperaturas.

4.5.2. Influência da temperatura na adsorção em tanque agitado na re-extração do AC

Para estudo em tanque agitado encamisado foram utilizados 50 g de resina em base úmida da resina Amberlite IRA-400Cl. Os resultados da extração do AC pelo SDFA composto por 15% (m/m) de PEG 600 e 17% (m/m) de fosfato, a $22 \pm 2^\circ \text{C}$ e pH 6,2, para obter a fase de topo para os experimentos de re-extração do AC, estão representados na Tabela 4.15.

Na Tabela 4.15 pode ser observado que, apesar de serem as mesmas condições utilizadas anteriormente para formação do SDFA, os coeficientes de partição foram aproximadamente 10 vezes maiores que a etapa anterior, e o rendimento na fase de topo se mantiveram acima de 90%. Apesar dos altos rendimentos apresentados pelo SDFA, o fato de um alto coeficiente de partição indica que houve degradação do AC pelo SDFA, principalmente na fase de fundo rica em fosfato. No entanto, estes resultados preliminares de rendimentos demonstram a viabilidade da utilização do SDFA para extração do AC após pré-tratamento por membranas.

Tabela 4.15. Resultados experimentais obtidos da extração do AC por SDFA, a temperatura de $22 \pm 2^\circ \text{C}$ e pH 6,2, e para re-extração do AC pela resina Amberlite IRA-400Cl em tanque agitado para avaliar influência da temperatura.

T ^(a) (°C)	C _{AC, amostra} (mg.L ⁻¹)	C _{AC, topo} (mg.L ⁻¹)	C _{AC, fundo} (mg.L ⁻¹)	K (-)	Rendimento (%)		
					Topo	Fundo	Total
10	326,2	82,6	1,5	55,1	92,2	1,0	93,2
20	326,1	86,4	1,4	61,7	96,4	1,0	97,4
30	357,3	87,1	1,6	54,5	98,5	1,0	99,5

a) Temperatura na qual foi mantido o tanque agitado.

Os experimentos em tanque agitado mostraram a influência da temperatura nas duas etapas da operação por troca iônica, sendo a primeira delas a etapa de re-extração do AC presente na fase de topo e a segunda referente ao processo de eluição da resina, para os dois casos foi possível acompanhar o comportamento do pH. Os resultados podem ser observados na Figura 4.34 e indicam que ocorre uma menor adsorção do AC na temperatura de 10°C . Este resultado corrobora com os resultados obtidos em coluna de leito fixo. O aumento da temperatura proporciona uma diminuição na viscosidade e um aumento da difusividade do PEG 600 e conseqüentemente do AC, que se encontra ligado ao PEG por forças de interação molecular. A Figura 4.35 mostra que a temperatura tem pouca influência na eluição do AC e da variação do pH.

Os resultados obtidos nos experimentos em tanque agitado reproduzem em parte os resultados em coluna de leito fixo, particularmente a etapa de adsorção. A etapa de eluição não mostrou o mesmo resultado, por exemplo, o tempo de eluição e a quantidade de AC adsorvido. Certamente, isso está relacionado aos coeficientes de transferência de massa, no caso particular da resistência à transferência de massa externa que, no caso do tanque agitado, é minimizada e também no coeficiente de dispersão axial que é notório para os reatores de leito fixo.

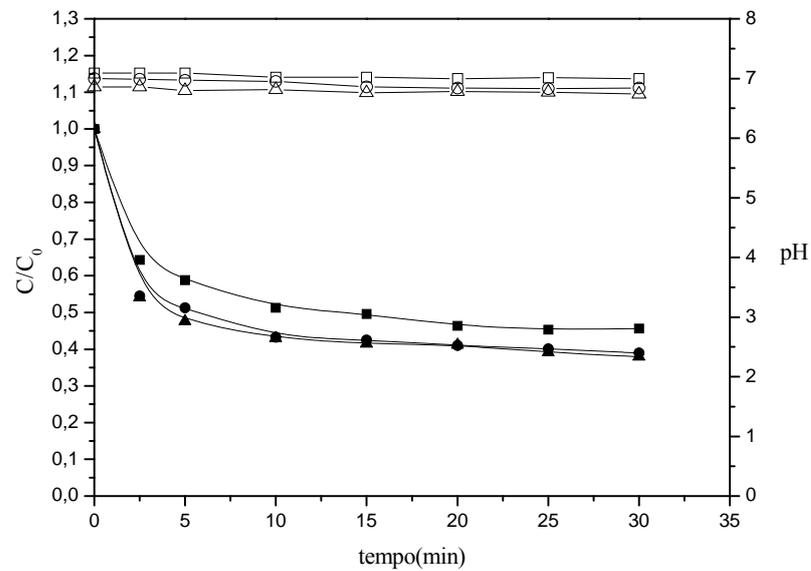


Figura 4.34. Curvas de adsorção do AC na resina Amberlite IRA-400Cl da fase PEG 600 em tanque agitado, para diferentes temperaturas. AC: 10° C (■), 20° C (●), 30° C (▲); pH: 10° C (□), 20° C (○), 30° C (△).

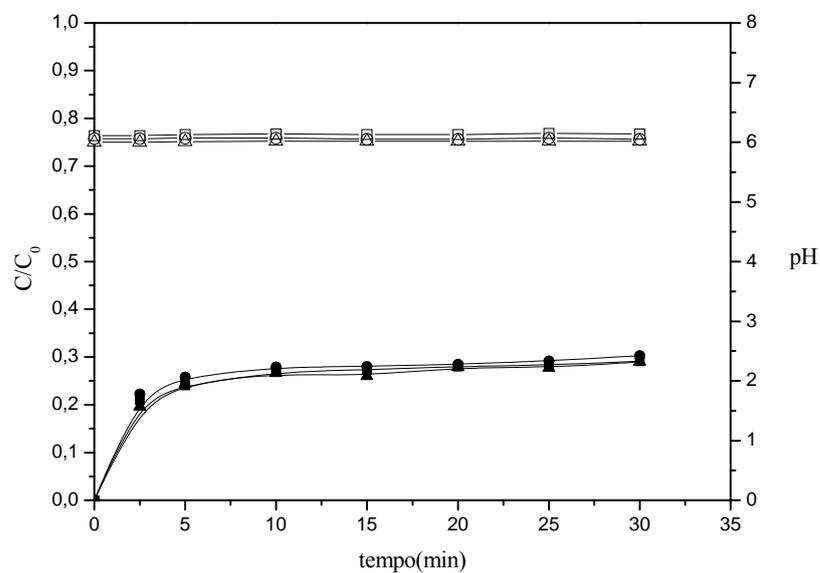


Figura 4.35. Curvas de eluição do AC da resina Amberlite IRA-400Cl para fase PEG 600 em tanque agitado, para diferentes temperaturas: AC: 10° C (■), 20° C (●), 30° C (▲); pH: 10° C (□), 20° C (○), 30° C (△).

4.5.3. Análise de fósforo e PEG na adsorção em tanque agitado na extração do AC

No processo com tanque agitado foi analisada adsorção e dessorção do PEG 600 e do fósforo na resina Amberlite IRA-400Cl. Como o PEG 600 é desprovido de cargas, portanto a diminuição da concentração do PEG 600 verificada é devido à difusão do deste nos poros da resina, que é influenciada pela temperatura de operação como mostra a Figura 4.36.

A temperatura tem pouca influência na adsorção final do fosfato. No entanto, a interferência dos íons de fosfato na adsorção do AC é evidente, devido a sua grande concentração de fósforo na fase de topo 12 g.L^{-1} e sua adsorção na resina que é próximo de 77% da concentração inicial como pode se observar na Figura 4.36.

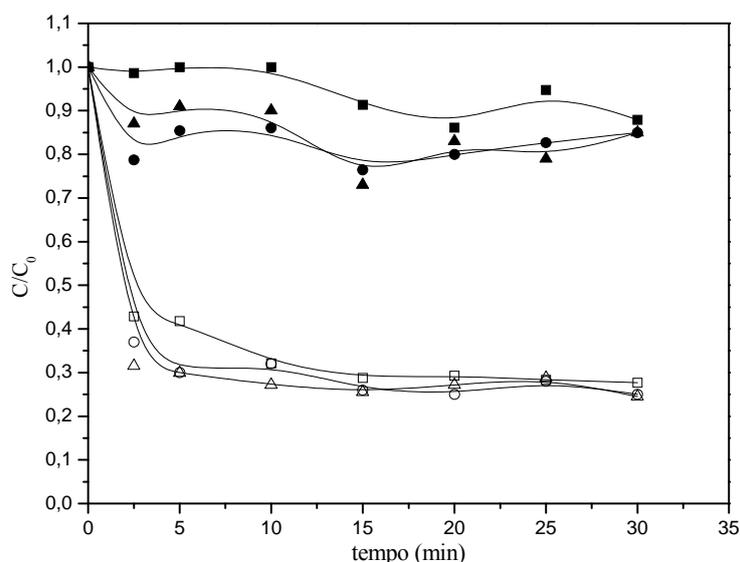


Figura 4.36. Curvas da etapa adsorção do PEG 600 e fósforo para diferentes temperaturas em tanque agitado. PEG 600: 10° C (■), 20° C (●), 30° C (▲); Fósforo: 10° C (□), 20° C (○), 30° C (△).

A Figura 4.37 mostra que a eluição do PEG 600 e do fósforo, após a lavagem com água deionizada. Neste caso é observada uma pequena quantidade de PEG na eluição correspondente a temperatura de 20 e 30° C próximos a 4,5 e 3%, respectivamente. Este fato pode estar relacionado à difusão do PEG 600 nos poros da resina, fato este que não é observado a 10° C. O aumento da temperatura tem pouca influência na eluição dos íons fosfatos conforme mostrado na Figura 4.37.

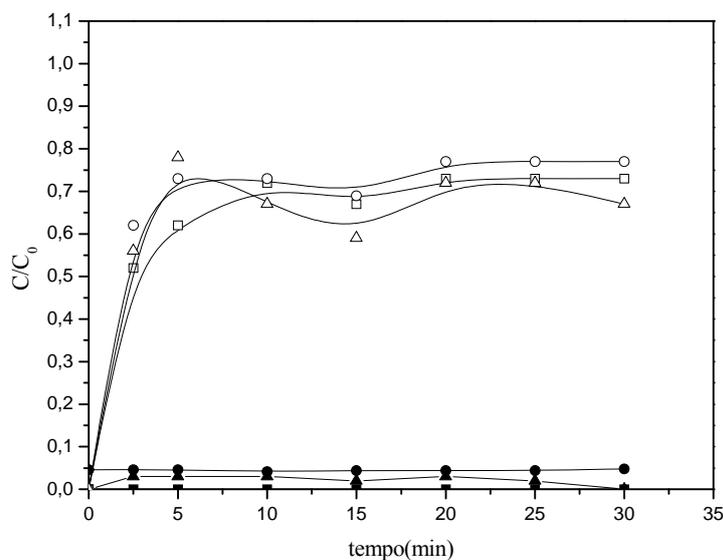


Figura 4.37. Curvas da etapa de eluição do PEG 600 e fósforo para diferentes temperaturas em tanque agitado. PEG 600: 10° C (■), 20° C (●), 30° C (▲); Fósforo: 10° C (□), 20° C (○), 30° C (△).

4.5.4. Resultados experimentais para as isothermas com a resina Amberlite IRA-400Cl na re-extração do AC da fase de topo do SDFa

Foram obtidas isothermas de adsorção do AC, proveniente da fase de topo do SDFa composto por PEG 600 e sais de fosfato, em resina Amberlite IRA-400Cl e a três valores de temperaturas. Os resultados obtidos estão representados na Figura 4.38. Para realizar a regressão não-linear utilizando os dados experimentais utilizou-se o modelo de Langmuir e de Freundlich; os seus parâmetros foram ajustados por regressão não-linear. Os parâmetros de cada modelo estão representados na Tabela (4.16).

De acordo com estes resultados, foi possível verificar que o modelo de Langmuir se ajusta aos valores experimentais, representando adequadamente o fenômeno. Os parâmetros da isoterma de Langmuir mostram que os valores de q_m obtidos são constantes indicando que a capacidade de adsorção da resina não se altera com a variação de temperatura (Tabela 4.16). Este é um resultado esperado, visto que esta capacidade está intrinsecamente relacionada com o número de sítios ativos disponíveis para uma adsorção em monocamada. Com relação ao termo K_D , é possível verificar seu aumento com o aumento da temperatura. Este resultado indica que o

aumento da temperatura desfavorece a adsorção, favorecendo o deslocamento do equilíbrio no sentido de dissociação do complexo.

O ajuste do modelo de Freundlich aos dados experimentais mostrou uma boa linearidade, pois os coeficientes de correlação são elevados ($R^2 \geq 0,992$). A magnitude do expoente n dá uma indicação sobre a favorabilidade de adsorção. Em geral, é indicado que os valores de n na faixa de 2-10 representam boa adsorção, 1-2 moderadamente dificultada, e menos de 1 uma baixa adsorção (HAMDAOUI; NAFFRECHOUX, 2007). A resina Amberlite IRA-400Cl é adsorvente que apresenta uma baixa adsorção para re-extração do AC da fase de topo do SDFA ($1 < n$) (Tabela 4.16).

Deve-se ressaltar que no presente trabalho há a forte influência dos sais de fosfato e da própria interação entre o PEG e o AC, que resulta em uma menor capacidade de troca quando comparado com resultados contendo apenas AC em solução sem PEG e fosfato. Portanto quando se compara os valores obtidos com os encontrados na literatura se verificam alterações quanto à capacidade de a constante de dissociação, tal como verificado nos trabalhos de BARBOZA; ALMEIDA; HOKKA (2002a) e MAYER *et al.* (1994).

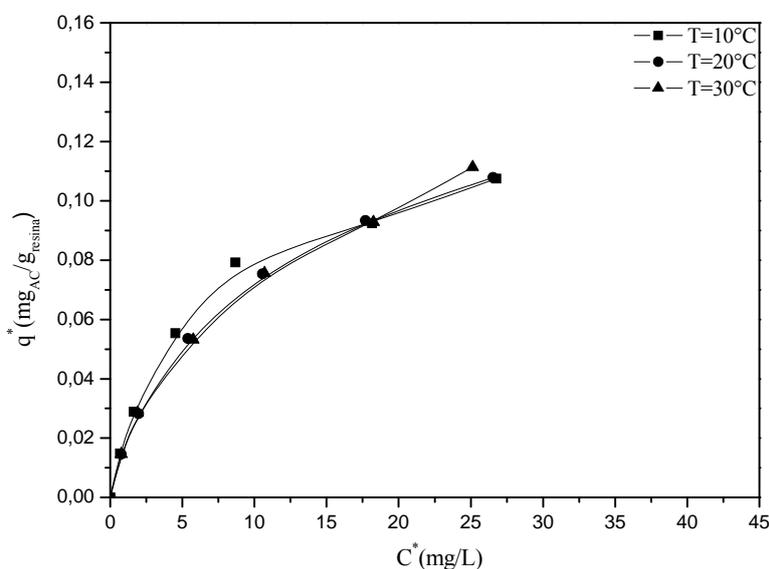


Figura 4.38. Isotherma de equilíbrio de adsorção do AC presente na fase de topo do SDFA composto por PEG 600 e fosfato, na resina Amberlite IRA-400Cl para diferentes temperaturas.

Tabela 4.16. Parâmetros da isoterma de Langmuir e de Freundlich determinados por regressão não-linear para fase de topo do SDFA composto por PEG 600 e sal de fosfato, na resina Amberlite IRA-400Cl.

Modelo de Langmuir			
T (°C)	q_m (mg _{AC} ·g _{res} ⁻¹)	K_D (mg·L ⁻¹)	R ² (-)
10	0,127 ± 0,005	5,57 ± 0,06	0,997
20	0,140 ± 0,006	8,46 ± 0,88	0,998
30	0,149 ± 0,011	9,94 ± 1,89	0,993
Modelo de Freundlich			
T (°C)	n (-)	K_F (mg ^{1-(1/n)} L ^{1/n} g ⁻¹)	R ² (-)
10	0,43 ± 0,04	0,027 ± 0,004	0,977
20	0,49 ± 0,03	0,022 ± 0,002	0,923
30	0,52 ± 0,02	0,021 ± 0,001	0,997

4.6. Efeito do etanol na re-extração do AC da fase de topo por troca iônica

Nesta etapa do trabalho após a separação e a coleta separadamente das fases do SDFA composto de 15% (m/m) de PEG 600 e 17% (m/m) de fosfato foi adicionado etanol na proporção 1,8:1 (v/v) à fase de topo, no intuito de precipitar parcialmente os sais de fosfato contidos na fase de topo reduzindo a concentração e a sua interferência na adsorção do AC a resina Amberlite IRA-400Cl, e possibilitar a re-extração do AC da fase de topo do SDFA pela resina Streamline QXL. Também nestes experimentos, foi analisado o efeito da temperatura na adsorção e dessorção do AC na presença de etanol na fase de topo.

4.6.1. Efeito do etanol na re-extração do AC da fase de topo pela resina Amberlite IRA-400Cl

Para resina Amberlite IRA-400Cl foram realizados experimentos em coluna de leito fixo (modelo XK 16 16/40), preenchida com 30 cm de altura de resina Amberlite

IRA-400Cl, vazão de $5,5 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ e a eluição foi feita com solução de NaCl 5 % (m/v). A Tabela 4.17 mostra os resultados experimentais da extração do AC pelo SDFa realizados à temperatura de $22 \pm 2^\circ \text{C}$ e da concentração de AC após adição do etanol.

Em relação aos resultados experimentais da extração do AC pelo SDFa obtidos nas etapas anteriores nota-se que há aumento de 6 vezes no coeficiente de partição. No entanto, os rendimentos de extração do AC na fase de topo se mantiveram próximos a 90%. O fato desta variação no coeficiente de partição pode estar diretamente relacionado à degradação do AC pelo SDFa, principalmente do AC presente na fase de fundo, uma vez que os rendimentos totais do SDFa estão abaixo de 100% (Tabela 4.17). Isto explicaria o fato que no estudo realizado por VIDEIRA; AIRES-BARROS (1994) para extração do AC em SDFa os autores obtiveram coeficientes de partição entre 1,5 e 114 e rendimentos acima de 90%.

Em relação à adição de etanol na fase de topo do SDFa, após a coleta de cada fase separadamente, este proporcionou a precipitação parcial dos sais de fosfato presente na solução, como já observado na etapa em que se avaliou o efeito da adição do etanol na re-extração do AC por membrana de UF (Item 4.3.3).

Tabela 4.17. Resultados experimentais obtidos da extração do AC por SDFa e da adição do etanol, a $22 \pm 2^\circ \text{C}$ e pH 6,2, e para re-extração do AC pela resina Amberlite IRA-400Cl em coluna de leito fixo.

T ^(a) (°C)	C _{AC, amostra} (mg.L ⁻¹)	C _{AC, topo} (mg.L ⁻¹)	C _{AC, fundo} (mg.L ⁻¹)	C _{AC, etanol} ^(b) (mg.L ⁻¹)	K (-)	Rendimento (%)		
						Topo	Fundo	Total
30	556,0	124,4	0,8	46,4	155,5	94,0	1	95,0
20	671,0	155,9	0,5	56,9	311,8	97,6	1	98,6
10	780,0	161,4	3,9	58,6	41,4	86,9	1	87,9

a) Temperatura na qual foi mantida a coluna de leito fixo.

b) Concentração de AC após a precipitação dos sais de fosfato por etanol da fase de topo.

A Figura 4.39 pode se observar à influência da temperatura na saturação e na eluição do AC da resina. A ruptura da coluna a temperatura de 10°C foi obtida em 10 min, enquanto que, a ruptura da coluna para as demais temperaturas ocorreu em aproximadamente em 17 min. Este fato está relacionado diretamente a difusão do AC nos poros da resina, uma vez que a diminuição da temperatura afeta o coeficiente de difusão do AC nos poros da resina, mas com a diminuição da temperatura a difusividade diminui, assim como a viscosidade aumenta. Assim, era de se esperar que nesta

temperatura se levasse mais tempo para saturar a coluna. Talvez esteja havendo a influência direta do etanol no processo de troca iônica, e isso só poderia ser mais bem explicado pelos estudos cinéticos e de transferência de massa. No entanto, a saturação da coluna não atinge 100% indicando degradação do AC pela resina em todas as temperaturas.

Durante o processo de lavagem da resina para retirar o excesso do AC, PEG e fosfato dos interstícios do leito ocorreu a dessorção do AC como mostra a Figura 4.39. Ainda cabe ressaltar que no processo de lavagem não há atraso, isto é, tem-se o pico de AC na lavagem no mesmo tempo para todos os experimentos. Esta dessorção do AC deve estar associada à substituição do AC pelos íons de fosfato em excesso no leito da coluna. A temperatura apresentou pouco efeito na eluição do AC da resina, fato este também observado para a evolução do pH durante o experimento. No entanto, as frações de eluição que contêm maiores concentrações de AC apresentaram pH entre 5,8 e 6,5, regiões estas de menor degradação do AC (BERSANETTI *et al.*, 2005) como mostra a Figura 4.40.

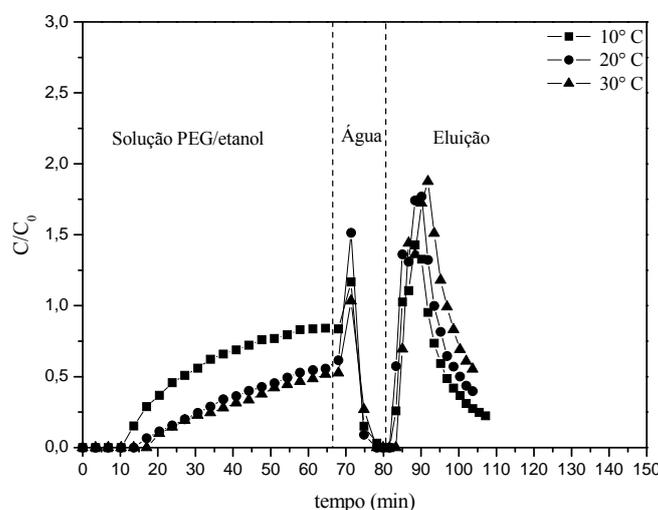


Figura 4.39. Curvas de saturação e eluição do AC presente na solução PEG/etanol na coluna de leito fixo com resina Amberlite IRA-400Cl para diferentes temperaturas.

A Figura 4.41 pode se observar que ocorreu uma retenção do PEG pelos poros da resina. Este fato é observado pelas frações coletadas durante a eluição em que concentrações de PEG foram próximas de 20% em relação à concentração inicial. Em

relação ao fósforo é observado que apesar de estar em baixa concentração em relação à concentração inicial após a precipitação ele ainda interfere diretamente na adsorção do AC e sua dessorção que ocorre juntamente com o AC. O fator de concentração para AC foi de 1,7 e para o fósforo foi de 5,7 (Figura 4.41).

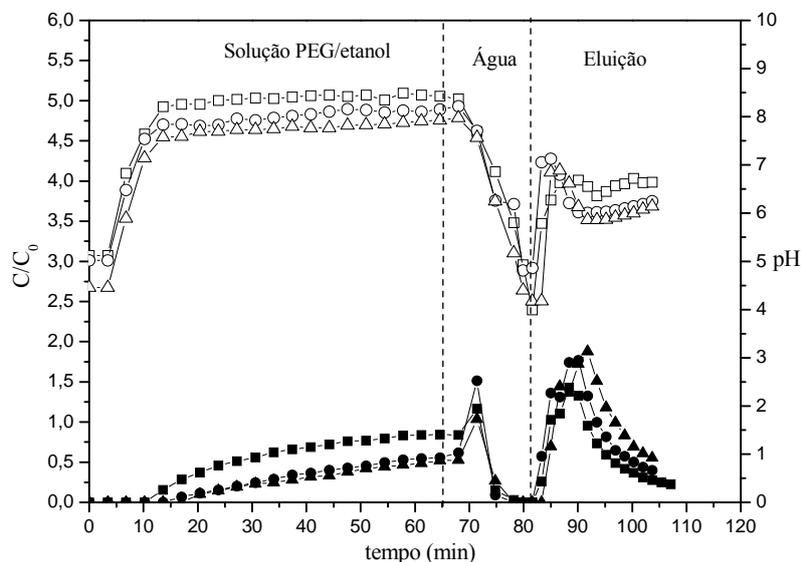


Figura 4.40. Evolução do pH durante re-extração do AC da solução PEG/etanol pela resina Amberlite IRA-400Cl para diferentes temperaturas. AC: 10° C (■), 20° C (●), 30° C (▲); pH - 10° C (□), 20° C (○), 30° C (△).

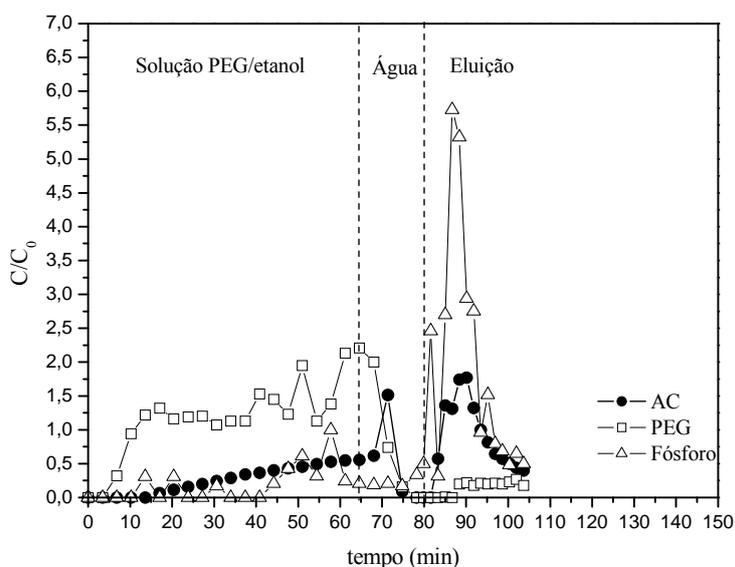


Figura 4.41. Evolução da concentração de PEG e do fósforo na re-extração do AC da solução fase de PEG/etanol em coluna de leito fixo com resina Amberlite IRA-400Cl, a temperatura de 20° C; $C_{Fos.,etanol} = 1,1 \text{ g.L}^{-1}$.

4.6.2. Efeito do etanol na cinética de re-extração do AC da fase de topo pela resina Amberlite IRA-400Cl

Para estudo em tanque agitado foram utilizados 50 g de resina em base úmida da resina Amberlite IRA-400Cl, e 100 mL da solução etanol/fase de topo do PEG 600. Os resultados da S DFA realizados a temperatura de $22 \pm 2^\circ \text{C}$ e a concentração de AC após adição do etanol, para re-extração do AC da fase de topo em tanque agitado estão representados na Tabela 4.18. Nesta etapa é observado que as concentrações iniciais do AC presente no caldo pré-tratado utilizados na extração pelo S DFA são superiores (1,4-3 vezes) às demais etapas anteriores. No entanto, foi observado o mesmo comportamento em relação ao rendimento na fase de topo acima de 90 % de recuperação do AC (Tabela 4.18).

Tabela 4.18. Resultados experimentais obtidos da extração do AC por S DFA e da adição do etanol, a $22 \pm 2^\circ \text{C}$ e pH 6,2, e para re-extração do AC pela resina Amberlite IRA-400Cl em tanque agitado.

T ^(a) (°C)	C _{AC, amostra} (mg.L ⁻¹)	C _{AC, topo} (mg.L ⁻¹)	C _{AC, fundo} (mg.L ⁻¹)	C _{AC, etanol} ^(b) (mg.L ⁻¹)	K (-)	Rendimento (%)		
						Topo	Fundo	Total
30	1082,3	247,3	8,1	86,7	30,5	95,6	0,1	95,7
20	1086,6	251,9	17,5	80,4	14,4	96,4	0,3	96,7
10	1072,9	245,3	2,2	89,3	245,3	93,9	0,5	94,4

a) Temperatura na qual foi mantida a coluna de leito fixo.

b) Concentração de AC após a precipitação dos sais de fosfato por etanol da fase de topo.

Na Figura 4.42 é possível verificar que o AC presente na solução PEG/etanol é adsorvido em 2,5 minutos, porém apenas 70% do AC foram adsorvidos indicando que capacidade máxima da resina foi atingida e, portanto sua saturação. A temperatura apresentou pouco efeito na capacidade de adsorção da resina como pode se observar na Figura 4.42. A temperatura apresentou uma pequena influência no pH durante o processo de adsorção do AC pela resina Amberlite IRA-400Cl. No entanto, ainda pode ser observada na Figura 4.40 uma redução do pH de 9,7 para 7,3 nos 5 minutos iniciais do processo de adsorção do AC da solução de PEG/etanol independente da temperatura. Este fato indica a influência dos ânions de fosfato na adsorção do AC pela resina Amberlite IRA-400Cl.

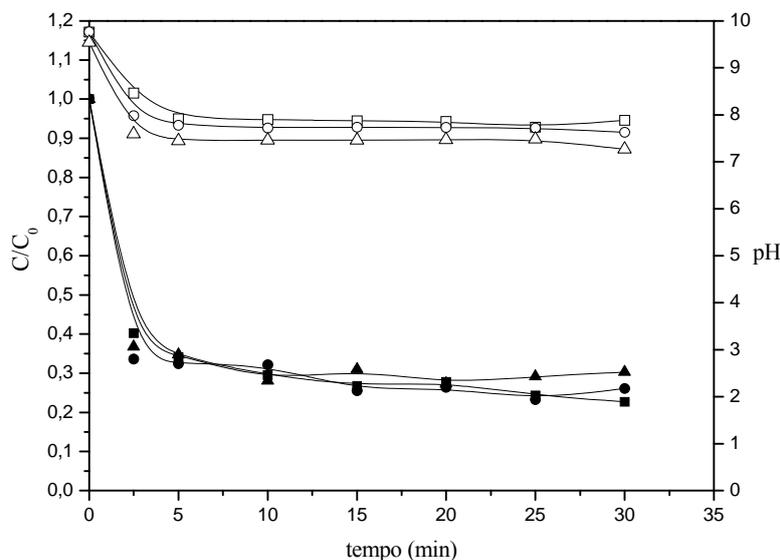


Figura 4.42. Curvas da etapa adsorção do AC presente na solução PEG/etanol na resina Amberlite IRA-400Cl para diferentes temperaturas; AC: 10° C (■), 20° C (●), 30° C (▲); pH: 10° C (□), 20° C (○), 30° C (△).

Na Figura 4.43 pode ser observada que a influência da temperatura na dessorção do AC da resina Amberlite IRA-400Cl, observa-se que a temperatura de 20° C proporciona uma melhor recuperação próxima de 60% da massa do AC contida na solução inicial. Esta diferença se deve ao fato que uma parte do AC foi eluída durante o processo de lavagem da resina com água deionizada para retirada do excesso de AC e do PEG, e um outro fator que contribui para esta diferença é a degradação do AC pelos sítios ativos da resina Amberlite IRA-400Cl, como já observado no trabalho de BARBOZA; ALMEIDA; HOKKA (2002b), e verificados em outras partes desta Tese. Fatores estes que contribuíram para que recuperação do AC nas temperaturas de 10° e 30° C fosse próxima de 34 e 47% de recuperação de AC, respectivamente.

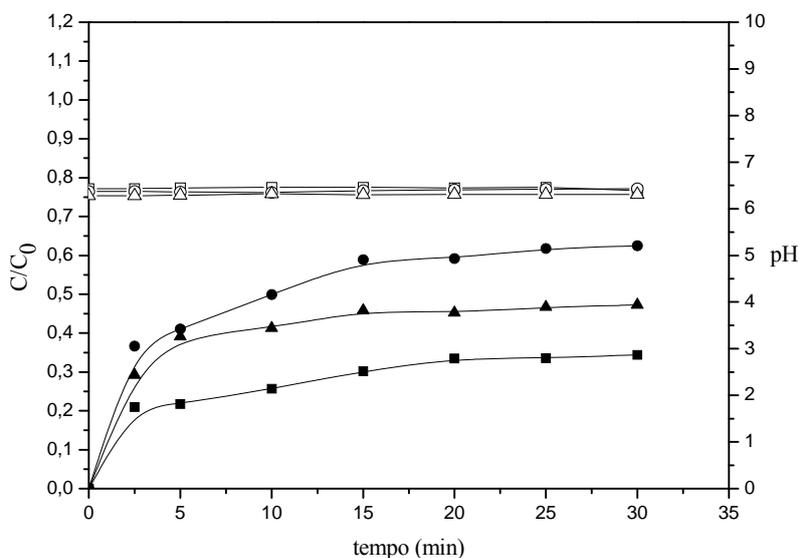


Figura 4.43. Curvas da etapa eluição do AC presente na solução PEG/etanol, na resina Amberlite IRA-400Cl para diferentes temperaturas; AC: 10° C (■), 20° C (●), 30° C (▲); pH: 10° C (□), 20° C (○), 30° C (△).

As Figuras 4.44a e 4.44b mostram os resultados da análise de fosfato e PEG na temperatura de 20° C durante a adsorção e dessorção do AC presente na solução PEG/etanol. Como já mencionado no item 4.5.3 ocorre uma redução da concentração inicial de PEG 600 na solução PEG/etanol. Além da precipitação do sal de fosfato da fase de topo o etanol faz com que haja uma redução na viscosidade da solução permitindo assim uma maior difusão do PEG nos poros da resina e conseqüentemente uma maior redução da concentração do PEG na solução (Figura 4.44a). Apesar de que o fosfato estar em baixa concentração após a precipitação por etanol ($C_{Fos.etanol} = 1,1 \text{ g.L}^{-1}$), este ainda influencia na adsorção do AC pela resina Amberlite IRA-400Cl, uma vez que a concentração do fosfato é reduzida a 48% da concentração inicial indicando saturação da resina pelo fosfato.

A Figura 4.44b mostra que o PEG é praticamente retirado pela lavagem com água deionizada. A concentração de PEG na etapa de dessorção fica próxima a 3%. No entanto, todo o fosfato adsorvido pela resina é eluído juntamente com AC sendo este com concentração final de 68% (Figura 4.44b).

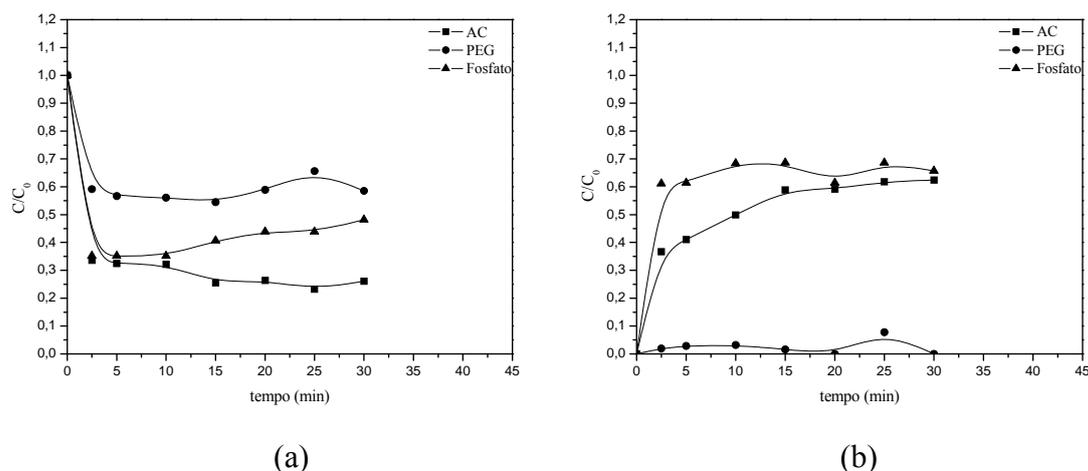


Figura 4.44. Curvas da etapa adsorção e eluição de PEG, fosfato e AC da solução PEG/etanol, na resina Amberlite IRA-400Cl, a temperatura de 20° C. a) adsorção; b) eluição.

4.6.3. Resultados experimentais para as isotermas com a resina Amberlite IRA-400Cl na re-extração do AC da fase de topo do SDFa após precipitação do sal de fosfato

Foram obtidas isotermas de adsorção do AC, proveniente da solução após a precipitação parcial do sal de fosfato da fase de topo do SDFa composto por PEG 600 e sais de fosfato, em resina Amberlite IRA-400Cl em duas diferentes temperaturas para verificar a influência de fator de equilíbrio de adsorção. Os resultados obtidos estão representados na Figura 4.45. Para realizar a regressão não-linear dos modelos e ajustá-los aos dados experimentais utilizou-se o modelo de modelo de Langmuir e de Freundlich para representar matematicamente estes dados equilíbrios. Os parâmetros otimizados de cada modelo estão representados na Tabela (4.19).

Os resultados na Tabela 4.19 demonstram que o modelo de Freundlich é que melhor se ajusta aos dados experimentais. Este resultado demonstra que a adsorção é favorável ($n \geq 3$) e por estar se trabalhando na faixa de concentração de equilíbrio muito baixa, ela se comporta de acordo com a Lei de Henry para soluções diluídas (Figura 4.45). A temperatura tem pouca influência nos parâmetros para ambos os modelos. No entanto, segundo o modelo de Langmuir a precipitação parcial do sais de fosfato da fase de topo do SDFa proporcionou um aumento de 4 vezes na capacidade de adsorção da

resina Amberlite IRA-400Cl em relação aos experimentos da etapa anterior sem a precipitação do sais de fosfato (Tabela 4.19).

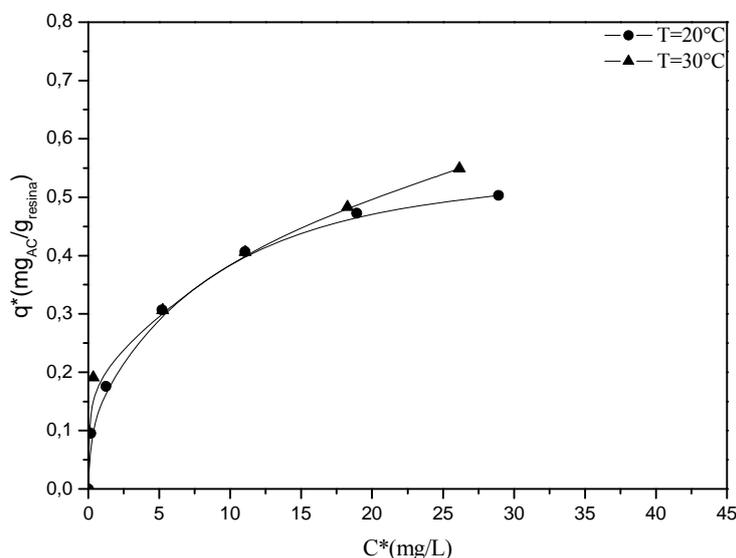


Figura 4.45. Isoterma de equilíbrio de adsorção do AC presente na fase de topo do SDFa após a precipitação do sal fosfato por etanol, na resina Amberlite IRA 400-Cl, nas temperaturas de 20 e 30° C.

Tabela 4.19. Parâmetros da isoterma de Langmuir e de Freundlich determinados por regressão não-linear para adsorção do AC presente na fase de topo do SDFa após a precipitação do sal fosfato por etanol, na resina Amberlite IRA-400Cl.

Modelo de Langmuir			
T (°C)	q_m (mg _{AC} ·g _{res} ⁻¹)	K_D (mg·L ⁻¹)	R ² (-)
20	0,54 ± 0,04	3,04 ± 0,94	0,97
30	0,47 ± 0,05	0,59 ± 0,41	0,89
Modelo de Freundlich			
T (°C)	n (-)	K_F (mg ^{1-(1/n)} L ^{1/n} g ⁻¹)	R ² (-)
20	3,11 ± 0,20	0,18 ± 0,01	0,99
30	3,64 ± 0,33	0,22 ± 0,02	0,99

4.6.4. Resultados experimentais com a resina Streamline Q XL na re-extração do AC da fase de topo do S DFA após precipitação do sal de fosfato

Para resina Streamline Q XL foram realizados experimentos em coluna de leito fixo (modelo XK 16 16/40), preenchida com 30 cm de altura de resina Streamline Q XL, vazão de 5,5 mL.min⁻¹ e a eluição foi feita com solução de NaCl 1% (m/v). Na Tabela 4.20 observa-se os resultados obtidos na S DFA realizados a temperatura de 22 ± 2° C e a concentração de AC após adição do etanol na fase de topo. Em relação à extração do AC pelo S DFA, este se apresentou altos valores de coeficientes de partição e rendimentos próximos de 85%, indicando uma possível degradação do AC na fase de topo e fundo do S DFA, como observado nas etapas anteriores (Tabela 4.20).

Tabela 4.20. Resultados experimentais obtidos da extração do AC por S DFA e da adição do etanol, a 22 ± 2° C e pH 6,2, e para re-extração do AC pela resina Streamline Q XL em coluna de leito fixo.

T ^(a) (°C)	C _{AC, amostra} (mg.L ⁻¹)	C _{AC, topo} (mg.L ⁻¹)	C _{AC, fundo} (mg.L ⁻¹)	C _{AC, etanol} ^(b) (mg.L ⁻¹)	K (-)	Rendimento (%)		
						Topo	Fundo	Total
30	610,3	156,0	0,5	62,0	312,0	95,0	1	96,0
20	740,2	149,1	0,5	56,5	298,2	84,6	1	85,6
10	740,0	150,5	0,5	57,2	301,0	85,4	1	86,4

a) Temperatura na qual foi mantida a coluna de leito fixo.

b) Concentração de AC após a precipitação dos sais de fosfato por etanol da fase de topo.

Após a precipitação do fosfato da fase de topo pode se observar na Figura 4.46 que a adsorção do AC pela resina Streamline Q XL foi possível. A temperatura apresentou a mesma influência na saturação observada para resina Amberlite IRA-400Cl, sendo a temperatura de 10° C atingir a saturação primeira. No entanto, a resina Streamline Q XL pode ser considerada uma resina não porosa (FERREIRA; CABRAL; PRAZERES, 2000), logo o processo limitado apenas pelo coeficiente de difusão do AC no filme do líquido. Observa-se a saturação da coluna no experimento realizado à temperatura de 10° C atingiu 1 indicando não degradação do AC pela resina Streamline Q XL (Figura 4.46). Durante a lavagem com água deionizada observa-se que para a temperatura de 30° C ocorreu uma maior dessorção do AC da coluna próxima a 20° C. Este fato pode estar relacionado ao estado de agitação das moléculas, fazendo que o processo de dessorção ocorra com maior intensidade para temperatura de 30° C. Na

eluição foram obtidas frações com fatores de concentração acima de 4,5 sendo que, para temperatura de 20° C foi obtido um fator de concentração de 7,5.

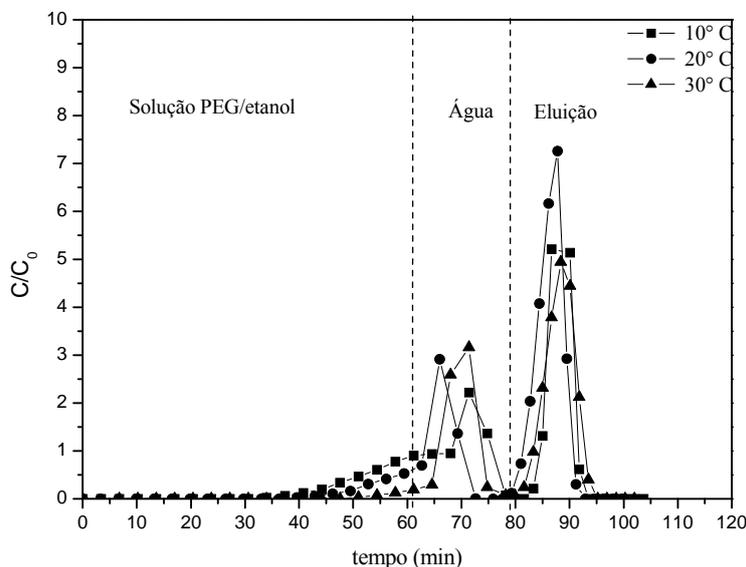


Figura 4.46. Curvas de saturação e eluição do AC presente na solução PEG/etanol na coluna de leito fixo com resina Streamline Q XL para diferentes temperaturas.

A temperatura apresentou pouca influência no pH durante a etapa de saturação da coluna, sendo pH 8,35 para as temperaturas de 10 e 30° C e pH 8 para temperatura de 20° C. Para as frações de maiores concentrações de AC coletadas na eluição apresentaram pH entre 5,8 e 6,5, valores esses em que há menores degradações segundo o trabalho de BERSANETTI *et al.* (2005), como mostra a Figura 4.47.

A análise de fósforo indica que o fosfato restante presente na fase de topo após a precipitação dos sais por etanol pode ser separado do AC pela resina Streamline Q XL como demonstra a Figura 4.48. As frações mais concentradas de fosfato saem após as frações de AC, este fato não foi observado com resina Amberlite IRA-400Cl. A resina Streamline Q XL também teve capacidade de separar o AC do PEG 600. Com este resultado, foi possível demonstrar que a resina Streamline Q XL é capaz de re-extrair o AC da fase de topo do SDFa mediante a precipitação do sal de fosfato por etanol.

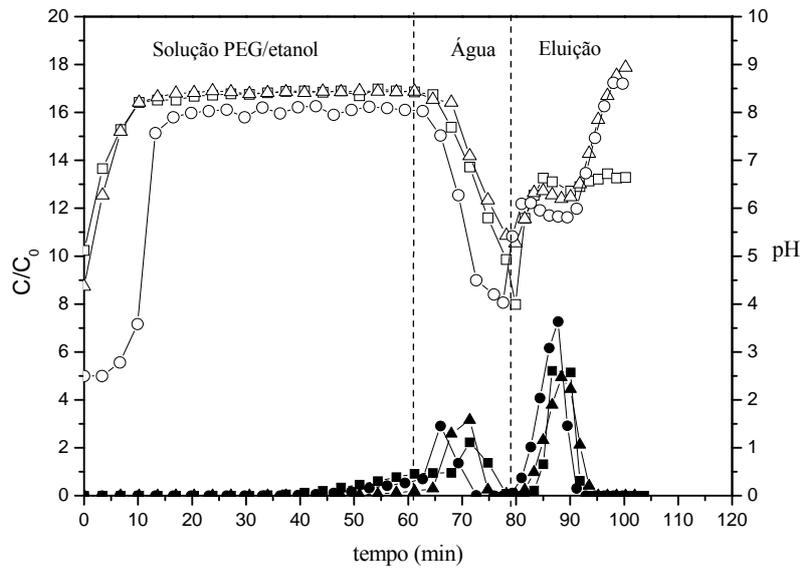


Figura 4.47. Evolução do pH durante re-extração do AC da solução PEG/etanol pela resina Streamline Q XL para diferentes temperaturas. AC: 10° C (■), 20° C (●), 30° C (▲); pH: 10° C (□), 20° C (○), 30° C (△).

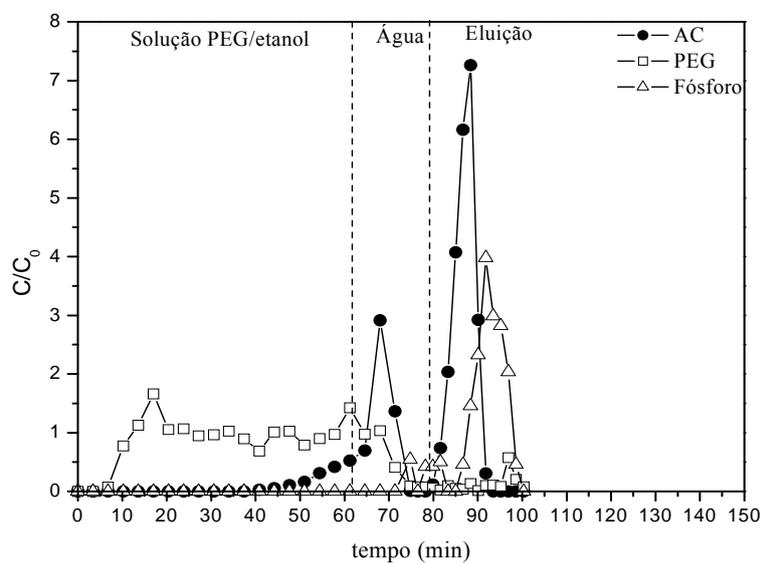


Figura 4.48. Concentração de PEG e do fósforo na re-extração do AC da solução PEG/etanol em coluna de leito fixo com a resina Streamline Q XL, a temperatura de 20° C e $C_{Fos.,etanol} = 0,75 \text{ g.L}^{-1}$.

4.6.5. Resultados experimentais da cinética de adsorção do AC na resina Streamline Q XL após precipitação do sal de fosfato

Os resultados dos estudos cinéticos de adsorção e dessorção do AC da solução etanol/fase de topo do PEG 600 na resina Streamline Q XL é apresentada nas Figuras 4.49 e 4.50, respectivamente. Os resultados da re-extração do AC da fase de topo em tanque agitado estão representados na Tabela 4.21. Os resultados das extrações do AC utilizando à mesma composição de S DFA apresentaram variações substanciais referente ao coeficiente de partição de uma etapa para outra. Este fato deve estar relacionado à degradação do AC principalmente referente ao AC contido na fase de fundo do S DFA. Esta variação pode ter sido ocasionada pelo tempo de análise do AC presente nas fases após a separação, uma vez que este tempo não foi monitorado. No entanto, os rendimentos do AC na fase topo mantiveram-se altos (85-98%) em todas as etapas, indicando que há diferença entre as taxas de degradação do AC nas fases de topo e fundo.

Tabela 4.21. Resultados experimentais obtidos da extração do AC por S DFA e da adição do etanol, a $22 \pm 2^\circ \text{C}$ e pH 6,2, para re-extração do AC pela resina Streamline Q XL em tanque agitado.

T ^(a) (°C)	C _{AC, amostra} (mg.L ⁻¹)	C _{AC, topo} (mg.L ⁻¹)	C _{AC, fundo} (mg.L ⁻¹)	C _{AC, etanol} ^(b) (mg.L ⁻¹)	K (-)	Rendimento (%)		
						Topo	Fundo	Total
30	943,1	212,3	8,4	88,7	25,3	96,1	0,1	96,2
20	943,6	222,9	3,9	91,9	57,2	98,0	0,9	98,9
10	1156,5	260,6	5,9	96,9	44,2	94,8	0,1	94,8

a) Temperatura na qual foi mantida a coluna de leito fixo.

b) Concentração de AC após a precipitação dos sais de fosfato por etanol da fase de topo.

A temperatura apresentou pouca influência na adsorção AC na resina Streamline Q XL como pode se observar na Figura 4.49. O fato da temperatura de 20°C apresentar uma adsorção 10% maior que a 10°C se deve a concentração inicial da solução (C_{AC, etanol}) contendo o AC ser menor cerca de 10% que a temperatura de 20°C (Tabela 4.21). No entanto, a dessorção do AC da resina após lavagem da resina com água deionizada para retirada do PEG e do excesso de AC, pode se observar na Figura 4.50 que a temperatura teve uma influência significativa na recuperação do AC. Com aumento da temperatura há naturalmente diminuição da viscosidade da solução, proporcionando com isso uma menor

interação do AC com o PEG e conseqüentemente um maior contato do AC com a resina. Visto que o contato do AC com a resina Streamline Q XL não ocasiona sua degradação, se observa com a resina Amberlite IRA-400Cl. A degradação é desprezível neste caso, pois experimento realizado a temperatura de 30° C e em 30 minutos segundo o trabalho realizado BERSANETTI *et al.* (2005) a degradação do AC nestas condições é considerada desprezível. Sendo assim, a diminuição da temperatura contribui para que o AC seja eluído juntamente com o PEG na lavagem da resina.

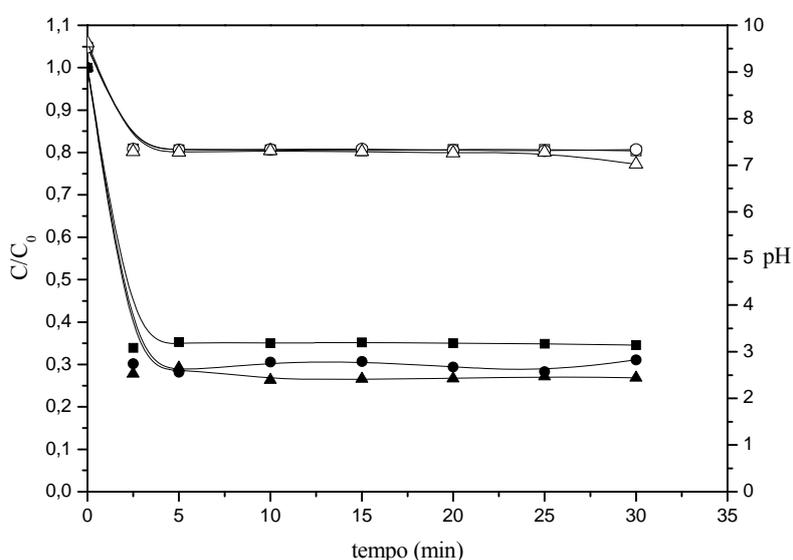


Figura 4.49. Curvas da etapa adsorção do AC presente na solução PEG/etanol na resina Streamline Q XL em tanque agitado, para diferentes temperaturas. AC: 10° C (■), 20° C (●), 30° C (▲); pH: 10° C (□), 20° C (○), 30° C (△).

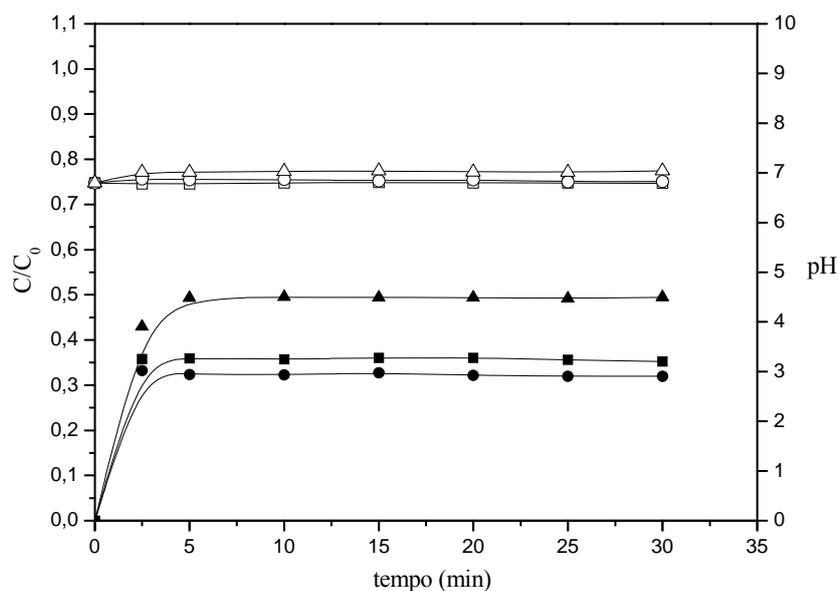


Figura 4.50. Curvas da etapa eluição do AC presente na solução PEG/etanol, para resina Streamline Q XL em tanque agitado, para diferentes temperaturas; AC: 10° C (■), 20° C (●), 30° C (▲); pH: 10° C (□), 20° C (○), 30° C (△).

As Figuras 4.51a e 4.51b mostram os resultados das análises de fosfato e PEG na temperatura de 20° C durante a adsorção e dessorção do AC presente na solução PEG/etanol. A redução de 20% na concentração inicial de PEG indica que ocorreu uma fraca interação entre a resina e o PEG (Figura 4.51a). Uma vez que, o PEG é desprovido de cargas e a resina sem poros este resultado demonstram que o PEG exerce uma pequena influência na adsorção do AC na resina Streamline Q XL. No entanto, esta interação não interfere na retirada total do PEG da resina durante a etapa lavagem da resina (Figura 4.51b). Sendo assim, o fosfato é maior interferente na adsorção do AC na resina Streamline Q XL como se observa nas Figuras 4.51a e 4.51b, ressaltando que mesmo após a precipitação do sal do fosfato pelo etanol, a concentração de fosfato é próximo a 1 g.L^{-1}

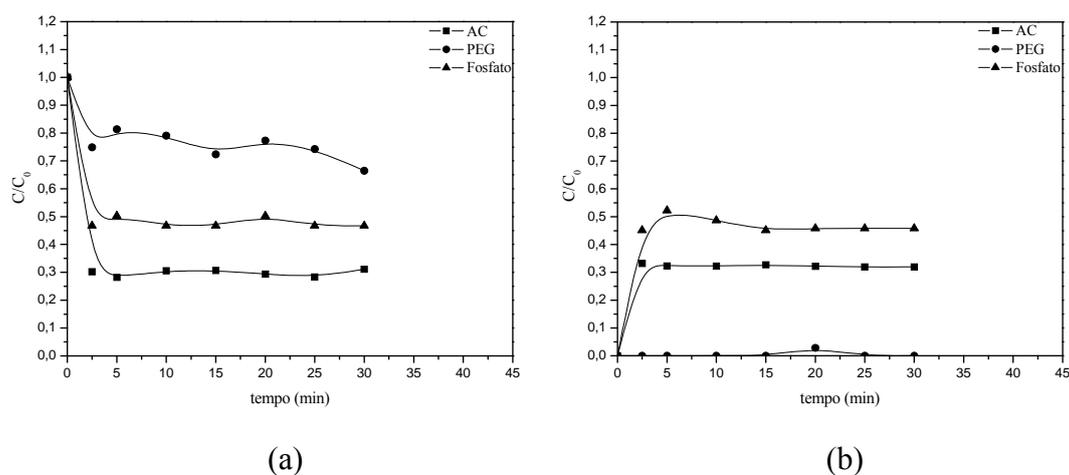


Figura 4.51. Curvas da etapa adsorção e eluição de PEG, fosfato e AC da solução PEG/etanol para resina Streamline Q XL em tanque agitado, a temperatura de 20° C. a) adsorção; b) eluição.

4.6.6. Resultados experimentais para as isotermas com a resina Streamline Q XL na re-extração do AC da fase de topo do S DFA após precipitação do sal de fosfato

As isotermas da adsorção do AC na resina Streamline Q XL podem ser observadas na Figura 4.52. Os modelos de Langmuir e Freundlich foram ajustados por regressão não-linear aos valores experimentais e os parâmetros de cada modelo estão representados na Tabela 4.22.

Devido à baixa concentração, o modelo de Freundlich apresentou o melhor ajuste aos dados experimentais obtidos, sendo que adsorção do AC pela resina Streamline Q XL é moderadamente dificultada, pois n é próximo de 2 (Tabela 4.22). A temperatura tem pouca influência nos parâmetros para ambos os modelos. Este fato se deve ao fosfato que é principal interferente na adsorção do AC na resina (Figura 4.50). No entanto, a precipitação parcial do sal de fosfato da fase de topo do S DFA pela adição do etanol proporcionou a viabilidade da utilização da resina Streamline Q XL na re-extração do AC da fase de topo. A capacidade máxima de adsorção da resina Streamline Q XL nestas condições foi próxima à da resina Amberlite IRA 400-Cl segundo o modelo de Langmuir que foi de $0,58 \text{ mg}_{AC}/\text{g}_{res}$.

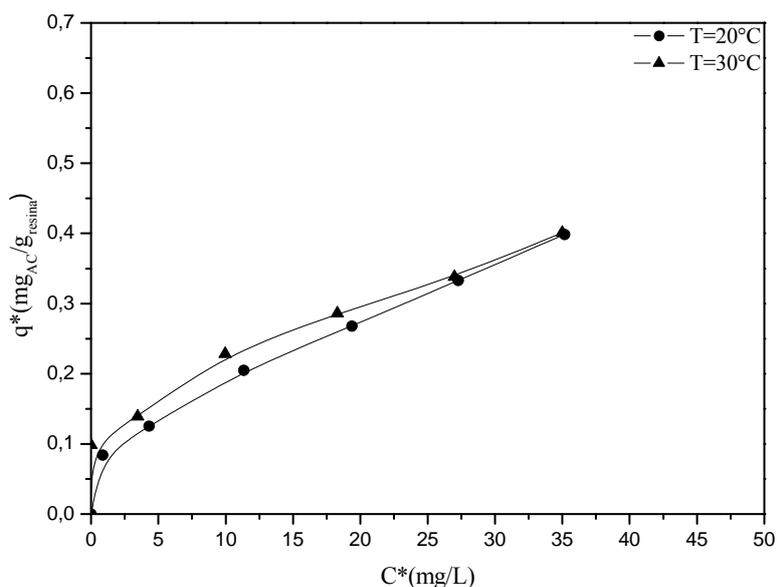


Figura 4.52. Isoterma de equilíbrio de adsorção do AC presente na fase de topo do SDFA após a precipitação do sal fosfato por etanol, na resina Streamline Q XL, nas temperaturas de 20 e 30° C.

Tabela 4.22. Parâmetros da isoterma de Langmuir e de Freundlich determinados por regressão não-linear para de adsorção do AC presente na fase de topo do SDFA após a precipitação do sal fosfato por etanol, na resina Streamline Q XL.

Modelo de Langmuir			
T (°C)	q_m (mg _{AC} ·g _{res} ⁻¹)	K_D (mg·L ⁻¹)	R ² (-)
20	0,58 ± 0,12	19,18 ± 8,80	0,96
30	0,50 ± 0,11	11,50 ± 7,00	0,90
Modelo de Freundlich			
T (°C)	n (-)	K_F (mg ^{1-(1/n)} L ^{1/n} g ⁻¹)	R ² (-)
20	1,93 ± 0,16	0,06 ± 0,01	0,99
30	2,62 ± 0,65	0,10 ± 0,03	0,94

4.6.7. Análises dos resultados experimentais em coluna de leito fixo com as resinas Amberlite IRA 400-Cl e Streamline Q XL para a re-extração do AC do SDFA

A avaliação do desempenho de uma coluna de adsorção é realizada a partir das curvas de ruptura obtidas em escala de bancada. Este tipo de análise foi realizado para a re-extração do AC da fase de topo de PEG. A partir dos dados experimentais de ruptura foram ajustadas curvas sigmoidais de Boltzman que as descrevem. A partir destas equações e ajustadas em função dos dados experimentais foi possível determinar os parâmetros de processos H_b , H_u , ϕ_1 , ϕ_2 e P , para diferentes temperaturas e para as resinas Amberlite IRA-400Cl e a Streamline Q XL. Estes resultados encontram-se apresentados na Tabela 4.23. Para a determinação do tempo de ruptura (t_b) foi considerada uma concentração de exaustão igual à aproximadamente 2% da concentração de alimentação (C_b) (McCABE; SMITH; HARRIOTT, 1993).

Nas Figuras 4.53 a 4.55 estão representadas as curvas de saturação e o ajuste da equação de Boltzman. Pode se observar boa concordância com os dados e experimentais e o ajuste, o que permite avaliar cada condição de re-extração do AC da fase de topo (Tabela 4.23).

Na Tabela 4.23 pode se observar que para os experimentos de re-extração do AC da fase de topo sem adição de etanol a redução da temperatura de 20° C para 10° C tem um efeito negativo na adsorção da resina Amberlite IRA-400Cl. No entanto, a temperatura apresenta pouca influência na eficiência recuperação do produto.

Adição de etanol para precipitação do fosfato faz com que a produtividade reduza aproximadamente 50% em relação ao processo anterior, uma vez que a adição do etanol dilui a concentração do AC na solução inicial e o fato da presença do sal de fosfato faz com que adsorção do AC seja dificultada, permitindo uma saída mais rápida da coluna, para caso sem adição de etanol. A redução da temperatura neste caso proporcionou um aumento na eficiência da recuperação do produto e na produtividade, fato deve estar relacionado à menor degradação do AC pela resina Amberlite IRA-400Cl, uma vez que a diminuição da temperatura faz com que haja uma redução na eficiência do leito, reflete o fato que a diminuição da temperatura aumenta a viscosidade da solução e dificultando a transferência de massa nos poros da resina.

Notam-se para ambos os casos que a necessidade de se avaliar as condições de operação que aumentem a eficiência da utilização do leito e a produtividade (Tabela 4.23). Isso pode ser realizado tendo o modelo que representa adequadamente o processo proposto devido à

degradação do AC nos sítios da resina e através otimização do processo, vale ressaltar que, sem adição do etanol a variação das condições do processo é extremamente limitada por causa da viscosidade da fase de topo do SDFA.

Adição do etanol na fase de topo do SDFA e a precipitação do sal de fosfato permitiram que ocorresse a adsorção do AC pela resina Streamline Q XL. No entanto a quantidade de amostra aplicada não foi suficiente para saturar o leito. Neste caso, para o ajuste da equação foi considerado que a concentração de saída atingiu-se 95% da concentração inicial (Figura 4.55), uma vez que em estudos anteriores (Item 4.4.2) foi demonstrado que não há degradação do AC pela resina. Pode-se observar, na Tabela 4.23, que a temperatura não teve influência nos parâmetros estudados e a eficiência da utilização do leito foi próxima a 90%, indicando um bom potencial da resina Streamline Q XL para remoção do AC da fase de topo, após a precipitação do sal de fosfato. No entanto, a adição do etanol dilui a solução da fase de topo do SDFA fazendo que a produtividade seja reduzida de 40%. Como já salientado anteriormente, há necessidade de avaliar melhor as condições do processo para que este seja operado em suas condições otimizadas.

Apesar da redução da capacidade das resinas (Amberlite IRA-400Cl e Streamline Q XL) utilizando esta sequência de purificação do AC (microfiltração, ultrafiltração, SDFA, precipitação) principalmente devido à presença do sal de fosfato na fase de topo da etapa de extração SDFA, estudos recentes, realizados por CUEL (2009) utilizando esta rota e a resina Streamline Q XL, demonstraram que há uma baixa degradação do AC, próxima a 8%, durante todo o processo, e que possibilita este obter ao final da cromatografia de troca iônica frações com alto grau de pureza em relação aos contaminantes de baixa massa molar, como os aminoácidos, viabilizando assim esta sequência de purificação do AC.

Tabela 4.23. Resultado da eficiência de utilização do leito, eficiência na recuperação do produto e produtividade em coluna de leito fixo na re-extração do AC da fase de topo do SDFa (McCABE; SMITH; HARRIOTT, 1993).

Resina	C_0 (mg/L)	Etanol	Vazão (mL/min)	t_b (min)	T (°C)	H_b (cm)	H_u (cm)	ϕ_1 (-)	ϕ_2 (-)	P (mg/min)	R^2 (-)
IRA-400 C1	132,8	Sem	6,0	4,9	30	9,6	30,8	0,23	0,53	0,35	0,993
IRA-400 C1	150,8	Sem	6,0	6,2	20	16,2	23,8	0,41	0,66	0,36	0,995
IRA-400 C1	101,3	Sem	6,0	5,7	10	17,5	22,5	0,43	0,53	0,17	0,992
IRA-400 C1	86,7	Adição	5,5	17,2	30	14,1	25,9	0,35	0,52	0,10	0,987
IRA-400 C1	80,4	Adição	5,5	14,2	20	12,1	27,9	0,30	0,56	0,13	0,994
IRA-400 C1	89,3	Adição	5,5	9,9	10	8,1	31,9	0,20	0,84	0,20	0,988
Streamline. Q XL	62,0	Adição	5,5	45,0	30	39,9	0,1	0,99	0,95	0,14	0,997
Streamline. Q XL	56,5	Adição	5,5	37,0	20	34,7	5,3	0,90	0,90	0,14	0,997
Streamline. Q XL	57,2	Adição	5,5	31,0	10	38,0	2,0	0,90	0,90	0,14	0,999

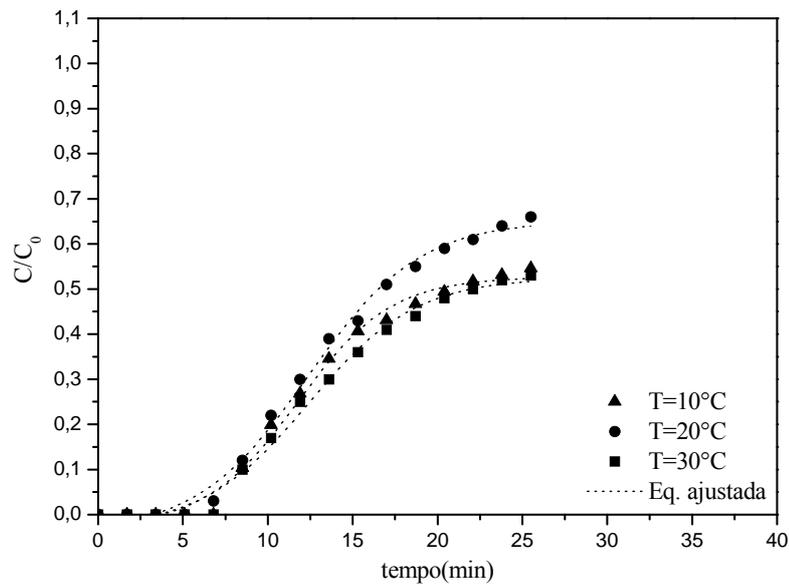


Figura 4.53. Curvas de ruptura, para a re-extração do AC do PEG, sem precipitação do fosfato, e seus respectivos ajustes para coluna com a resina Amberlite IRA 400-Cl, submetida a diferentes temperaturas e vazão de $6 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$.

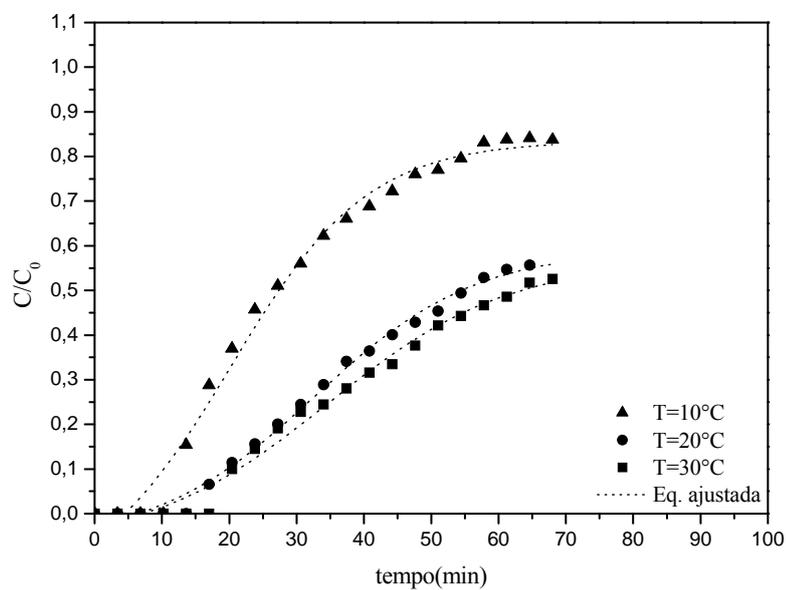


Figura 4.54. Curvas de ruptura, para a re-extração do AC do PEG, com fosfato precipitado, e seus respectivos ajustes para coluna com a resina Amberlite IRA 400-Cl, submetida a diferentes temperaturas e vazão de $5,5 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$.

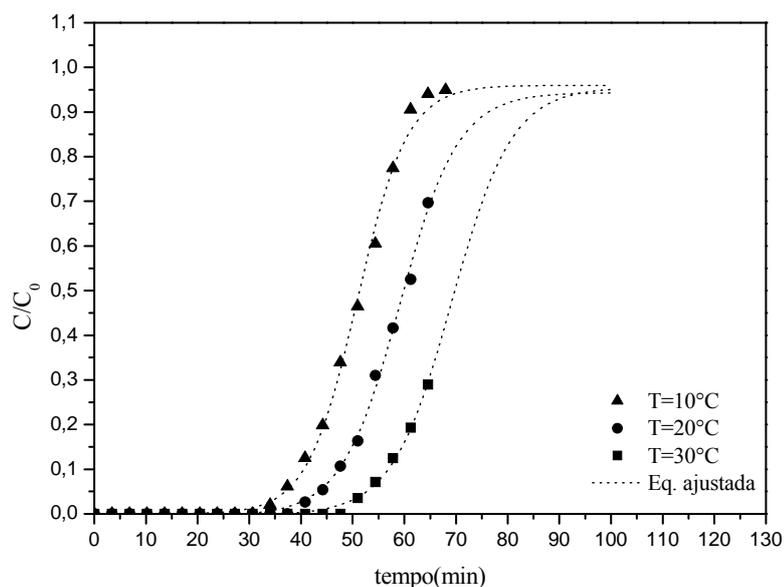


Figura 4.55. Curvas de ruptura, para a re-extração do AC do PEG com fosfato precipitado, e seus respectivos ajustes para coluna com a resina Streamline Q XL, submetida a diferentes temperaturas e vazão de $5,5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$.

4.6.8. Conclusões da etapa de re-extração do AC da fase de topo do SDFA

Como conclusões revelantes da pesquisa da etapa de re-extração do AC da fase de topo do SDFA utilizando a membrana de ultrafiltração e as resinas Amberlite IRA-400Cl e a Streamline Q XL se pode dizer que:

4.6.8.1. Re-extração do AC fase de topo do SDFA por ultrafiltração

1. A utilização da membrana de ultrafiltração de fluxo tangencial para re-extração do AC da fase rica em PEG do SDFA não apresentou resultados satisfatórios para um processo de re-extração do AC da fase de topo do SDFA. Apesar de que a retenção de ambos os PEGs pela membrana, ficou demonstrado que o AC fica retido juntamente com o PEG.

2. A adição de etanol na fase de topo influenciou apenas a formação da camada de gel diminuindo a sua resistividade, sendo esta 10 vezes menor.

4.6.8.2. Análise da resina de troca iônica Streamline Q XL na purificação do AC

1. A resina de troca iônica Streamline Q XL proporcionou um fator de concentração próximo de 4 para o AC proveniente de caldo de cultivo pré-tratado com a membrana de UF de 3 kDa e um fator de purificação acima de 5 e rendimento do processo acima de 95%. A concentração de NaCl necessária para eluir o AC foi de 1% (m/v).

2. A membrana de MF de 0,2 μm apresentou efeitos semelhantes na purificação do caldo de AC em relação à membrana de MF de 0,1 μm , indicando que não há necessidade da utilização da última, uma vez que o filtrado da membrana de MF de 0,1 μm apresenta cromatograma de contaminantes semelhante ao filtrado proveniente da membrana de MF de 0,2 μm .

3. Referente às membranas de ultrafiltrações, a membrana de UF de 50 kDa proporcionou uma purificação semelhante à membrana de UF de 3 kDa, indicando que a maioria dos contaminantes presente no caldo que atravessa por uma membrana de MF de 0,2 μm possui dimensões inferiores a 3 kDa.

4. O estudo da curva de equilíbrio demonstra que a resina Streamline Q XL em relação ao AC apresenta uma queda da quantidade adsorvida com o aumento da concentração de AC em solução, indicando que adsorção do AC na resina Streamline Q XL ocorre em multicamadas.

4.6.8.3. Re-extração do AC da fase de topo do SDFa por troca iônica

1. Na cromatografia de troca iônica ficou evidenciado que a resina Amberlite IRA-400Cl possibilita o processo re-extração do AC da fase de topo do SDFa independentemente do PEG. O processo por troca iônica também permitiu a extração do fosfato da fase de topo, tendo assim a possibilidade de reciclagem do mesmo.

2. O fosfato presente na fase de topo do SDFa dificulta adsorção do AC para ambas as resinas estudadas.

3. A diminuição da temperatura apresentou baixa influência na cinética de adsorção do AC na re-extração do AC da fase de topo do SDFa pela resina Amberlite IRA-400Cl.

4. Adição do etanol para precipitação dos sais de fosfato possibilitou a re-extração do AC da fase de topo do SDFa pela resina Streamline Q XL com fatores de concentração acima de 5. A resina Streamline Q XL possibilitou a separação do AC e do fosfato, fato este não observado para a resina Amberlite IRA-400Cl. No entanto, adição do etanol faz com que a eficiência do processo de extração para resina Amberlite IRA-400Cl reduza em 40% devido à diluição.

5. Devido às baixas concentrações de AC nas soluções PEG/etanol o modelo de Fleudlinch foi o que melhor se ajustou aos dados experimentais obtidos na determinação da curva de equilíbrio.

4.7. Otimização dos parâmetros envolvidos na purificação do AC através do sistema de duas fases aquosas

Nesta etapa do estudo, objetivando um processo contínuo e uma melhor condição de trabalho do SDFa, foi realizada uma otimização dos parâmetros que envolvem o SDFa.

Foram estudadas as influências de cinco variáveis no coeficiente de distribuição (K), rendimento e fator de purificação do SDFa. As variáveis massa molecular do PEG (mPEG), pH, temperatura, linha de amarração (*tie-line length-TLL*) e razão entre volumes de cada fase ($rTLL$), que foram consideradas as que possuem influência no SDFa. A realização experimental e do planejamento estão descrita no item 3.4.3. O *software Statistica* (versão 5.0) foi usado para regressão e análises gráficas dos dados obtidos.

4.7.1. Planejamento fatorial 2^5 para SDFa

Para os experimentos de otimização foi utilizado um caldo pré-tratado em membrana de 3 kDa e concentração de ácido clavulânico de 405 mg.L^{-1} .

A matriz das condições estabelecidas no delineamento, bem como os resultados de K e R (%) encontram-se apresentados na Tabela 4.24. As Tabelas 4.25 e 4.26 apresentam os efeitos estimados das variáveis nas respostas analisadas a 10% de significância ($p < 0,1$). Pelos valores dos efeitos pode-se observar que a variável mais

importante para estas duas respostas é a razão entre os volumes das fases rTLL(D). O aumento desta variável de 0,75 a 1,25 apresenta um incremento tanto no coeficiente de distribuição como no rendimento. O aumento do mPEG(A) de 600 a 4000 provocou uma diminuição tanto no K como no rendimento. Para o K , as interações entre as variáveis, conforme apresentado na Tabela 4.25, mostra maior significância nas interações $A \times C$, $A \times D$ e $C \times D$. Em relação ao rendimento, três variáveis têm efeitos estatisticamente significativos (nível de confiança de 90%), sendo que TLL (E) e rTLL(D) apresentam efeito positivo (Tabela 4.26).

A variável mPEG(A) proporciona um efeito negativo no rendimento. As interações que apresentam efeitos significativos são $A \times E$ e $C \times D$. A variável Temp(C) está relacionada à taxa de degradação do AC que é diretamente proporcional ao aumento da temperatura (BERSANETTI *et al.*, 2005) (Tabela 4.26). Por outro lado, diminuição da temperatura provoca um aumento na viscosidade dificultando a manipulação do sistema (GONZALEZ-TELLO; CAMACHO; BELLZQUEZ, 1994), por este motivo ela foi fixada a 20° C no DCCR.

O pH(B) não apresentou nenhum efeito significativo para faixa estudada (6,5-7,5) para ambos os parâmetros, coeficiente de distribuição e rendimento. Isso ocorre devido à proximidade do ponto isoelétrico, em que a somatória das cargas da mesma é praticamente nula (Tabela 4.25 e 4.26). No entanto, estudos têm demonstrado que substâncias carregadas negativamente são preferencialmente separadas na fase de topo e substâncias carregadas positivamente são separadas na fase de fundo e para faixas maiores de pH apresenta influência no coeficiente de distribuição e nos rendimentos na separação do AC por SDFA (LEE; SANDLER, 1990; VIDEIRA; AIRES-BARROS, 1994). Sendo assim, o pH foi mantido na segunda etapa do trabalho.

Tabela 4.24. Planejamento fatorial 2⁵ e as resposta para a análise dos efeitos na extração do AC em S DFA.

Ensaio	Códigos dos valores					Resposta	
	A (mPEG)	B (pH)	C (Temp)	D (rTLL)	E (TLL)	K	R(%)
1	-1	-1	-1	-1	-1	3,4	66,4
2	1	-1	-1	-1	-1	3,7	49,6
3	-1	1	-1	-1	-1	4,4	68,3
4	1	1	-1	-1	-1	5,0	55,9
5	-1	-1	1	-1	-1	4,9	86,4
6	1	-1	1	-1	-1	3,4	49,0
7	-1	1	1	-1	-1	7,8	66,0
8	1	1	1	-1	-1	4,7	55,1
9	-1	-1	-1	1	-1	5,9	90,0
10	1	-1	-1	1	-1	4,2	80,7
11	-1	1	-1	1	-1	7,0	88,9
12	1	1	-1	1	-1	5,9	84,4
13	-1	-1	1	1	-1	18,1	88,8
14	1	-1	1	1	-1	6,8	66,7
15	-1	1	1	1	-1	15	83,3
16	1	1	1	1	-1	10,2	65,6
17	-1	-1	-1	-1	1	4,6	67,6
18	1	-1	-1	-1	1	6,3	63,0
19	-1	1	-1	-1	1	6,6	72,8
20	1	1	-1	-1	1	7,9	64,4
21	-1	-1	1	-1	1	4,6	58,1
22	1	-1	1	-1	1	3,5	77,2
23	-1	1	1	-1	1	7,3	58,1
24	1	1	1	-1	1	4,4	81,6
25	-1	-1	-1	1	1	15,9	90,6
26	1	-1	-1	1	1	9,4	90,3
27	-1	1	-1	1	1	10,0	89,2
28	1	1	-1	1	1	10,8	95,9
29	-1	-1	1	1	1	10,0	85,3
30	1	-1	1	1	1	3,3	82,1
31	-1	1	1	1	1	8,4	84,5
32	1	1	1	1	1	7,9	86,0
33 (pc)	0	0	0	0	0	8,3	92,0
34 (pc)	0	0	0	0	0	9,7	93,2
35 (pc)	0	0	0	0	0	11,1	94,0

Tabela 4.25. Estimativa dos efeitos para K .

	Efeito	Erro padrão	t(19)	p-valor
Média	7,44	0,39	19,28	0,0000
mPEG(A)	-2,28	0,81	-2,82	0,0108
pH(B)	0,95	0,81	1,18	0,2516
Temp(C)	0,58	0,81	0,72	0,4788
rTLL(D)	4,15	0,81	5,14	0,0001
TLL(E)	0,66	0,81	0,82	0,4249
A*B	1,07	0,81	1,32	0,2019
A*C	-1,70	0,81	-2,11	0,0482
A*D	-1,69	0,81	-2,10	0,0497
A*E	0,55	0,81	0,68	0,5072
B*C	0,43	0,81	0,53	0,6009
B*D	-0,76	0,81	-0,94	0,3593
B*E	-0,25	0,81	-0,30	0,7642
C*D	0,75	0,81	0,92	0,3671
C*E	-3,34	0,81	-4,14	0,0006
D*E	-0,33	0,81	-0,41	0,6878

Tabela 4.26. Estimativa dos efeitos para $R(\%)$.

	Efeito	Erro padrão	t(19)	p-valor
Média	76,31	1,60	47,68	0,0000
mPEG(A)	-6,05	3,35	-1,81	0,0866
pH(B)	0,51	3,35	0,15	0,8800
Temp(C)	-2,76	3,35	-0,83	0,4196
rTLL(D)	19,55	3,35	5,84	0,0000
TLL(E)	6,35	3,35	1,90	0,0732
A*B	3,28	3,35	0,98	0,3403
A*C	0,15	3,35	0,04	0,9647
A*D	-0,06	3,35	-0,02	0,9853
A*E	10,34	3,35	3,09	0,0061
B*C	-2,19	3,35	-0,65	0,5214
B*D	-0,10	3,35	-0,03	0,9765
B*E	1,78	3,35	0,53	0,6022
C*D	-5,70	3,35	-1,70	0,1050
C*E	0,15	3,35	0,04	0,9647
D*E	0,59	3,35	0,18	0,8626

4.7.2. Planejamento fatorial 2^4 para S DFA

Os valores originais de cada nível utilizado no DCCR estão apresentados na Tabela 3.5. A otimização do coeficiente de distribuição, rendimento e fator de purificação foi realizada um DCCR de 4 variáveis que corresponde a 24 experimentos e 3 experimentos para ponto central (Tabela 4.27). De acordo com a Tabela 4.27, maior valor para coeficiente de distribuição ocorreu no ensaio 17. Este resultado está associado ao melhor rendimento do sistema. Através dos resultados foi obter modelos matemáticos para coeficiente de distribuição, rendimento e fator de purificação. Os parâmetros foram considerados significativos com $p < 0,1$, sendo os termos não significativos incorporados aos resíduos para o cálculo da ANOVA. A ANOVA para o coeficiente de distribuição e rendimento, considerando apenas os termos estatisticamente significativos, está apresentada na Tabela 4.28.

O coeficiente de determinação para K foi igual 87,45%, rendimento foi de 90,37% e FP de 87,12%. O teste F foi significativo para ambos os casos, sendo os modelos adequados para descrever os resultados através da superfície resposta.

Para o K obteve-se um modelo de primeira ordem, indicando que K é função todas as variáveis na faixa analisada. No entanto, os modelos para o rendimento e fator de purificação foram de segunda ordem verificando-se que os termos lineares pH e TLL não foram significativos a 10% de significância. Para os termos quadráticos mPEG, rTLL e TLL e o termo interativo entre mPEG e pH tem significância na correlação dos coeficientes a 10% de significância ($p < 0,10$). As Equações 4.1, 4.2 e 4.3 representam os modelos codificados.

$$K = 6,95 - 1,88mPEG + 1,52pH + 1,42rTLL + 1,17TLL - 0,91mPEG * TLL \quad (4.1)$$

$$R(\%) = 95,95 - 5,65mPEG + 11,03rTLL - 5,33rTLL^2 - 2,56mPEG^2 - 3,36TLL^2 + 2,96mPEG * pH \quad (4.2)$$

$$FP = 1,99 + 0,15mPEG - 0,14rTLL - 0,25TLL^2 + 0,30mPEG * pH + 0,21mPEG * rTLL - 0,18mPEG * TLL + 0,20pH * rTLL \quad (4.3)$$

Tabela 4.27. Planejamento e respostas obtidas nos experimentos do DCCR.

Ensaio	Códigos dos valores				Respostas		
	mPEG	pH	rTLL	TLL	<i>K</i>	<i>R</i> (%)	<i>FP</i>
1	-1	-1	-1	-1	3,4	74,9	1,94
2	-1	-1	-1	1	5,9	82,6	2,39
3	-1	-1	1	-1	5,8	97,1	0,75
4	-1	-1	1	1	11,1	98,3	1,79
5	-1	1	-1	-1	6,3	75,9	1,58
6	-1	1	-1	1	10,6	74,9	1,67
7	-1	1	1	-1	9,0	91,7	1,24
8	-1	1	1	1	15,0	98,2	1,24
9	1	-1	-1	-1	3,6	61,6	1,99
10	1	-1	-1	1	3,8	46,3	1,30
11	1	-1	1	-1	3,7	88,9	1,36
12	1	-1	1	1	7,5	81,7	1,24
13	1	1	-1	-1	4,4	62,3	2,02
14	1	1	-1	1	7,6	69,8	1,97
15	1	1	1	-1	8,0	94,7	2,98
16	1	1	1	1	4,4	86,9	2,51
Pontos axiais							
17	-2	0	0	0	15,2	99,0	2,04
18	2	0	0	0	4,8	82,0	2,44
19	0	-2	0	0	4,0	93,5	1,99
20	0	2	0	0	12,0	92,3	2,02
21	0	0	-2	0	3,3	60,5	2,09
22	0	0	2	0	10,7	98,3	1,30
23	0	0	0	-2	4,1	86,4	0,63
24	0	0	0	2	7,3	88,1	1,29
Pontos centrais							
25	0	0	0	0	7,1	97,6	2,21
26	0	0	0	0	7,5	95,2	2,17
27	0	0	0	0	6,2	95,1	1,59

Tabela 4.28. Análise da variância para os modelos de previsão de *K* e rendimento e fator de purificação.

Fonte de variação	Graus de liberdade	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	F-calc	F-tab	R ²	p-valor
<i>K</i>							
Regressão	5	267,31	53,46	16,70	2,39	87,45	<0,01
Resíduos	12	38,36	3,20				
Total	17	305,67	-				
<i>R</i> (%)							
Regressão	6	4714,38	785,73	18,76	2,33	90,37	<0,01
Resíduos	12	502,60	41,88				
Total	18	5216,99	-				
<i>FP</i>							
Regressão	7	6,79	0,97	12,13	2,28	87,12	<0,01
Resíduos	12	1,00	0,08				
Total	19	7,79	-				

Através da análise das curvas de contornos, representadas nas Figuras de 4.56 a 4.58, foi possível verificar que quanto maior a massa molecular do PEG, mais favorável à fase salina torna-se a distribuição independente do parâmetro associado. Este fato está relacionado à interação entre as moléculas. Neste caso quanto menor o tamanho da molécula de PEG maior interação entre as moléculas de AC e dos componentes do sistema. PEG com massas moleculares maiores apresentam uma maior hidrofobicidade na fase topo. Assim compostos mais hidrofóbicos, tais como alguns aminoácidos que apresentam grupo aromático em sua composição, têm maior afinidade pela fase de topo, quando se trabalha com PEG de maior massa molecular. No entanto, a diminuição dos parâmetros pH, rTLL e TLL desfavorece a distribuição à fase PEG, conforme mostram as Figuras 4.56 a 4.58, fato também observado por VIDEIRA; AIRES-BARROS (1994).

As Figuras de 4.59 a 4.61 mostram que aumento do rTLL e TLL e a diminuição da mPEG e pH favorecem um maior rendimento. A região de pH entre 6,10 e 6,50 apresenta rendimento próximo a 100% de recuperação do AC (Figura 4.59). Esta faixa de pH está relacionada à região de menor de degradação do AC (BERSANETTI *et al.*, 2005).

O aumento do pH promoveu uma diminuição da força eletrostática de certos compostos, visto que neutraliza parcialmente os compostos catiônicos presentes em solução, o AC é um ânion e, portanto, com o aumento do pH é possível separá-lo de

compostos catiônicos, como por exemplo, o aminoácido lisina. No entanto, deve-se ressaltar que o aumento do pH em solução resulta em uma maior degradação do AC causando diminuição do rendimento. Simultaneamente, o aumento de íons fosfato promoveu um aumento da repulsão de compostos aniônicos, o que favorece o aumento do coeficiente de distribuição para o AC. O aumento do pH e da massa molecular do PEG promove um aumento da hidrofobicidade e da interação eletrostática de compostos que são separados aumentando a purificação. No entanto a perda é maior por conta da degradação. As análises das curvas de contorno para o fator de purificação demonstram que valores acima de 1,5 vezes para regiões ótimas de rendimento, conforme mostram as Figuras de 4.62 a 4.64.

De acordo com os modelos matemáticos otimizado, o nível ótimo dos quatro parâmetros para o rendimento e fator de purificação são: PEG 400, pH 6,4, TLL 42 e rTLL 1,3, correspondendo um rendimento do S DFA próximo a 100% e fator de purificação de 1,5 vezes para o ácido clavulânico.

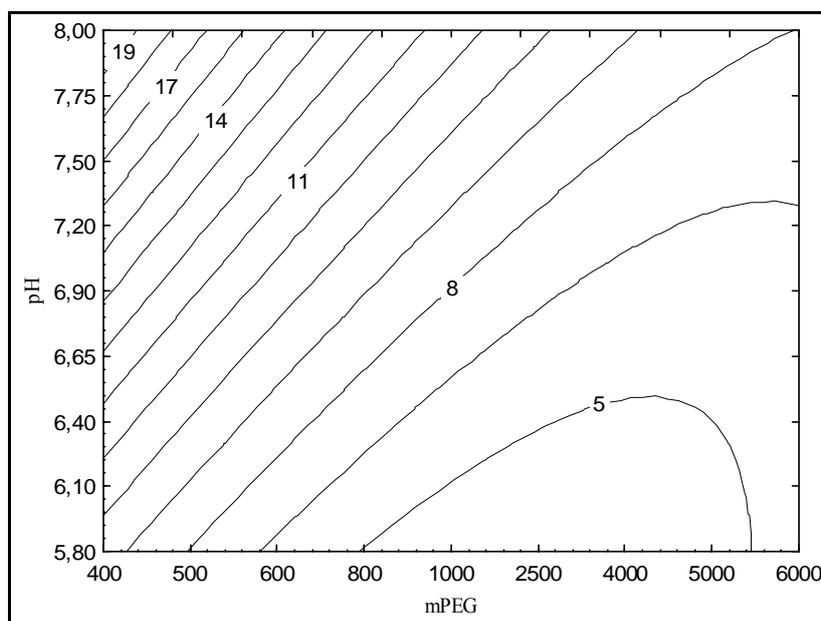


Figura 4.56. Curva de contorno para o K em função de mPEG e pH.

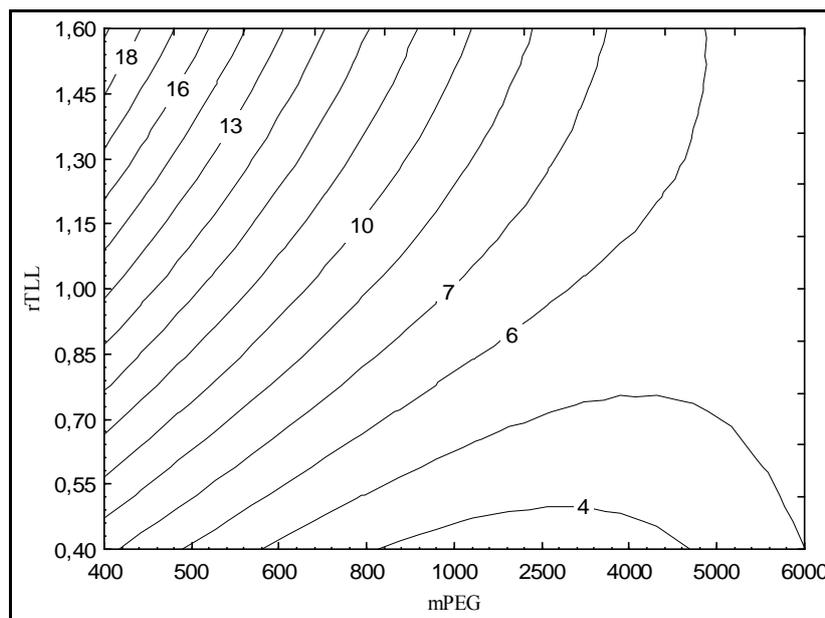


Figura 4.57. Curva de contorno para o K em função de mPEG e rTLL.

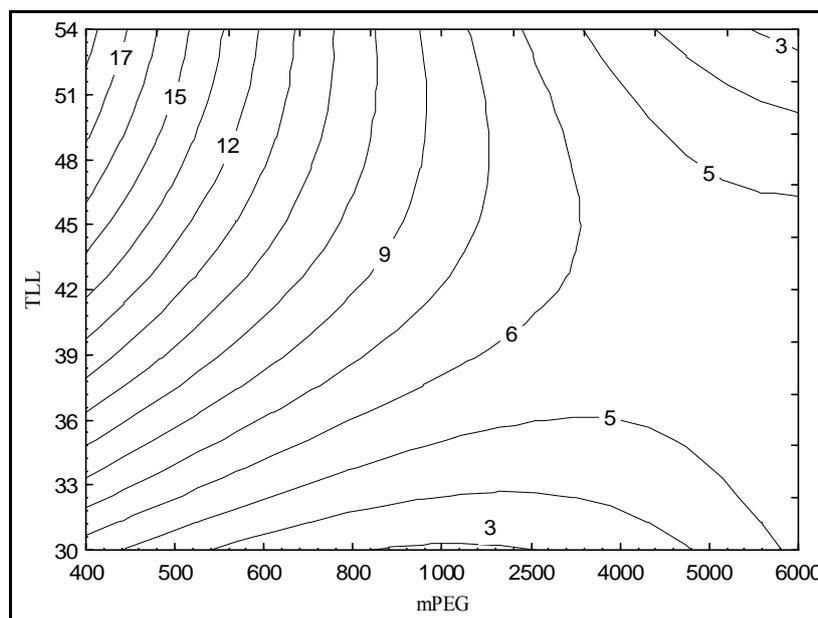


Figura 4.58. Curva de contorno para o K para ácido clavulânico por SFA: mPEG vs TLL.

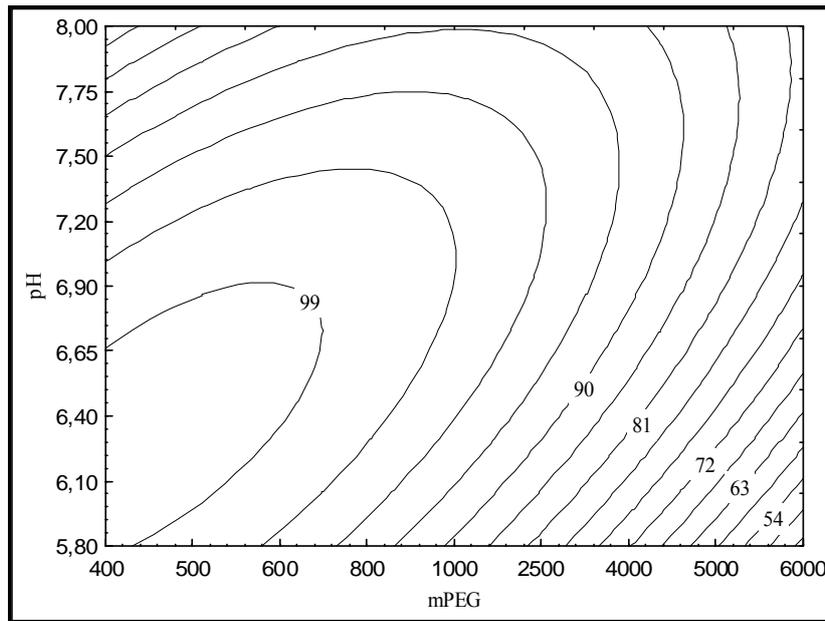


Figura 4.59. Curva de contorno para o $R(\%)$ em função de mPEG e pH.

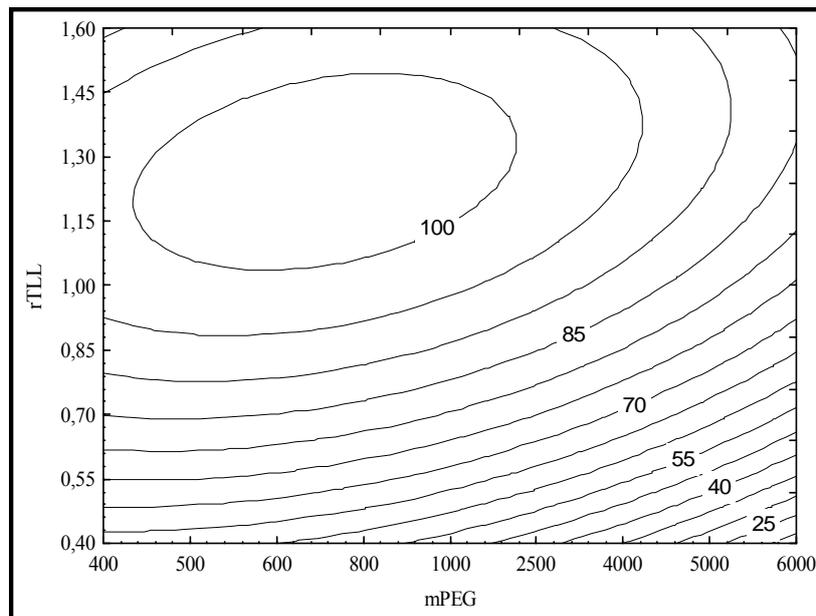


Figura 4.60. Curva de contorno para o $R(\%)$ em função de mPEG e rTLL.

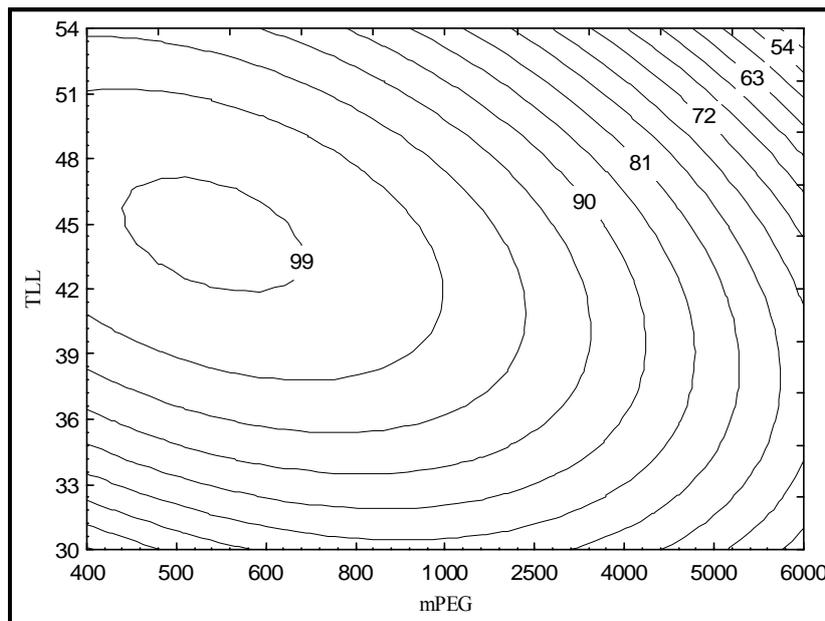


Figura 4.61. Curva de contorno para o $R(\%)$ em função de mPEG e TLL.

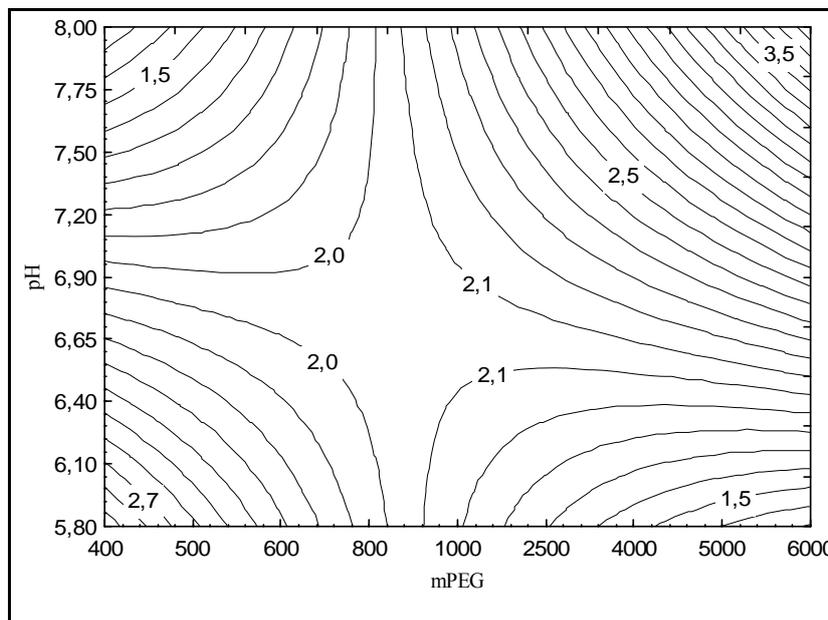


Figura 4.62. Curva de contorno para o FP em função de mPEG e pH.

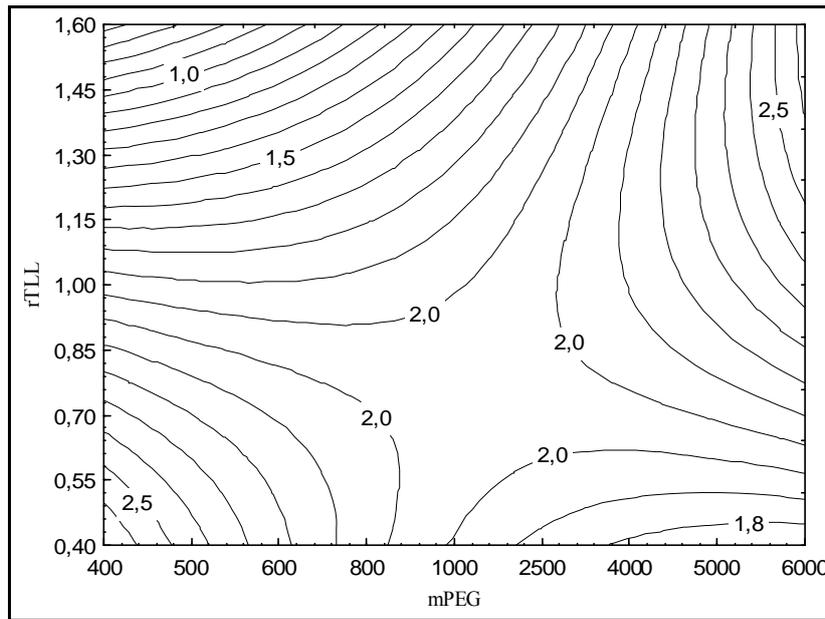


Figura 4.63. Curva de contorno para o *FP* em função de mPEG e rTLL.

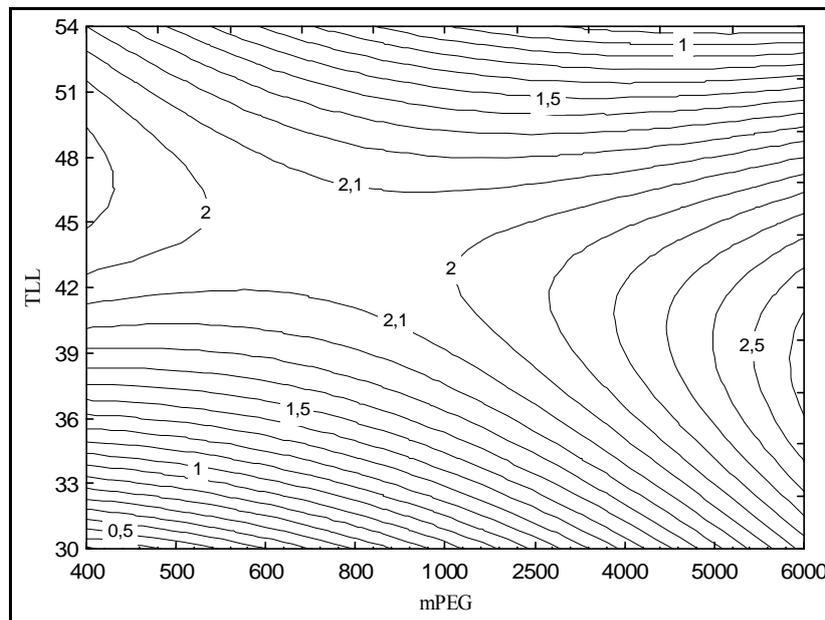


Figura 4.64. Curva de contorno para o *FP* em função de mPEG e TLL.

4.7.3. Conclusões da etapa de otimização do sistema de duas fases aquosas

Como conclusões revelantes da otimização do sistema de duas fases aquosas para extração e purificação do AC se pode dizer que:

1. O Delineamento composto central rotacional permitiu maximizar as condições dos quatro parâmetros identificados aumentando, assim, o coeficiente de distribuição, o rendimento e o fator de purificação. As melhores faixas de trabalho para o rendimento e o fator purificação permitem um rendimento próximo entre 90-100% e uma purificação entre 1,5-2 na extração do AC.

2. O nível ótimo dos quatro parâmetros estudados para o rendimento e fator de purificação foram: PEG 400, pH 6,4, TLL 42 e rTLL 1,3, correspondendo um rendimento do SDFa próximo a 100% e fator de purificação de 1,5 vezes para o ácido clavulânico.

4.8. Análise da variação da concentração do AC na extração por SDFa

Com base nos trabalhos realizados anteriormente por VIDEIRA; AIRES-BARROS (1994) e HIRATA (2002) foram realizados experimento para avaliar a influencia do aumento da concentração inicial do AC no SDFa com composições fixas de 20% de PEG e 18% Fosfato.

As Figuras 4.65a e 4.65b mostram a partição do clavulanato de potássio em SDFa composto por diferentes massas molares de PEGs em função do aumento da concentração do AC. O coeficiente de partição permanece praticamente constante para todos os PEGs apesar do aumento da concentração do AC na solução inicial. Somente para os com PEG 600 e 400 apresentaram um alto valor do coeficiente de partição para baixa concentração de clavulanato de potássio na amostra inicial adicionada ao sistema como pode se observa na Figura 4.65a. Os coeficientes de partição para os sistemas utilizando PEG 400 e 600 foram superiores aos com PEG 1000, 4000 e 6000 como observa na Figura 4.65a e 4.65b. Este fato também observado na recuperação do clavulanato de potássio para os sistemas com PEG 400 e 600 que foi próximo a 90% e para os sistemas com PEG 1000, 4000 e 6000 de 55%. A recuperação do clavulanato de potássio, Y , foi calculada com a fração mássica de clavulanato de potássio recuperada na fase de topo. É evidente que fatores como pH, linha de amarração e razão entre volumes

das fases contribuem para as diferenças encontradas para o coeficiente de partição e recuperação do clavulanato de potássio como demonstrados no item 4.7.2.

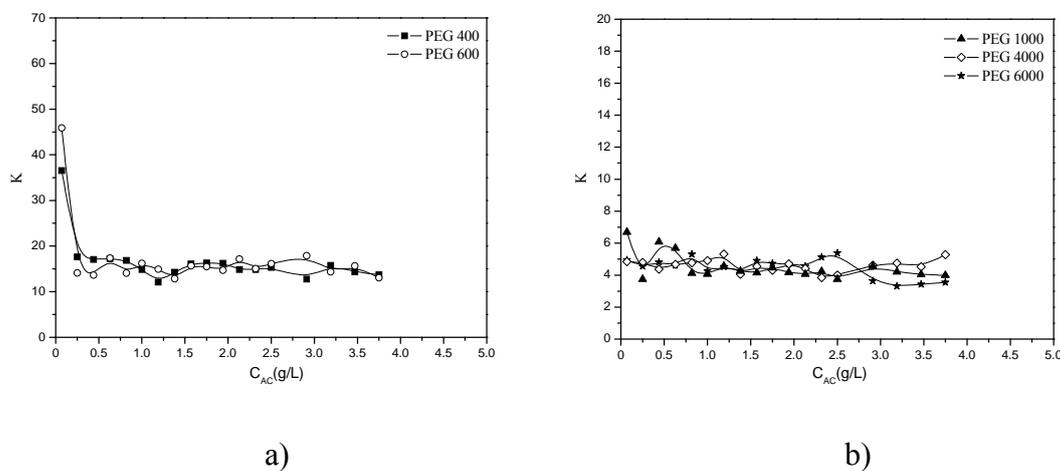


Figura 4.65. Efeito da concentração do AC no coeficiente de partição do AC em SDFA composto de PEG e sais fosfato de potássio, a temperatura de 25° C.

No entanto, a relação entre quantidades de PEG e de clavulanato de potássio presentes nas fases de topo e de fundo em função da concentração de clavulanato de potássio adicionada ao sistema de duas fases aquosas é uma relação linear independente da massa molecular do PEG como mostram as Figura 4.66a e 4.66b. Considere-se que a partição como uma razão de equilíbrio onde o AC interage com PEG através de forças intermoleculares antes da separação das fases do SDFA. Este processo pode ser descrito por:



Considerando a hipótese que a interação entre o AC e PEG está diretamente relacionada com as quantidades de mols presentes nas fases de topo e de fundo no SDFA, e que esta interação ocorre em uma região linear e de baixa concentração. Como esta em equilíbrio após a separação das fases. Sob estas condições, a constante de equilíbrio K_{eq} para a interação entre o PEG e o AC adicionado ao SDFA pode ser descrita como:

$$K_{eq} \propto q/C \quad 4.5$$

onde q é massa de AC na fase do SDFa por mol de PEG presente na fase, C é a concentração de AC adicionado ao sistema, e a razão q/C é referente à afinidade entre o PEG e AC.

A relação entre a quantidade de AC na amostra inicial em relação à concentração de AC e PEG presentes na fase de topo e fundo se mostrou linear dentro da faixa estudada como pode se observar na Figura 4.66.

A Tabela 4.29 mostra os valores de K_{eq} obtidos nestes experimentos. Nota-se que há uma maior afinidade entre AC e o PEG de maior peso molecular na fase de topo, em contrapartida, esta maior interação entre o PEG e AC ocorre também na fase de fundo; isto faz com que o coeficiente de partição seja menor para os PEGs de maior peso molecular. Então para um SDFa em que a porcentagem de PEG é menor na fase de fundo acaba promovendo uma maior recuperação do AC. Outro fato que deve se ressaltar é que o aumento da quantidade de massa de PEG no SDFa para os PEGs de maiores pesos moleculares proporciona um aumento na viscosidade de forma exponencial segundo o trabalho realizado por MEI *et al.* (1995).

Considerando a relação entre a constante de equilíbrio da fase de topo em relação à constante de equilíbrio da fase de fundo podemos escrever a seguinte equação:

$$K^0 = \frac{K_{eq,topo}}{K_{eq,fundo}} \quad 4.6$$

Na Tabela 4.29 pode se observar que o coeficiente de partição (K) se diferencia de K^0 , esta diferença indica que outros fatores são preponderantes para a partição do AC pelo SDFa como mencionados no Item 2.4.2. No entanto, os resultados obtidos nesta etapa demonstram que uma variação na concentração de entrada da molécula alvo em SDFa com a composição definida e constante, não proporciona variações significativa nos resultados dos coeficientes de partição.

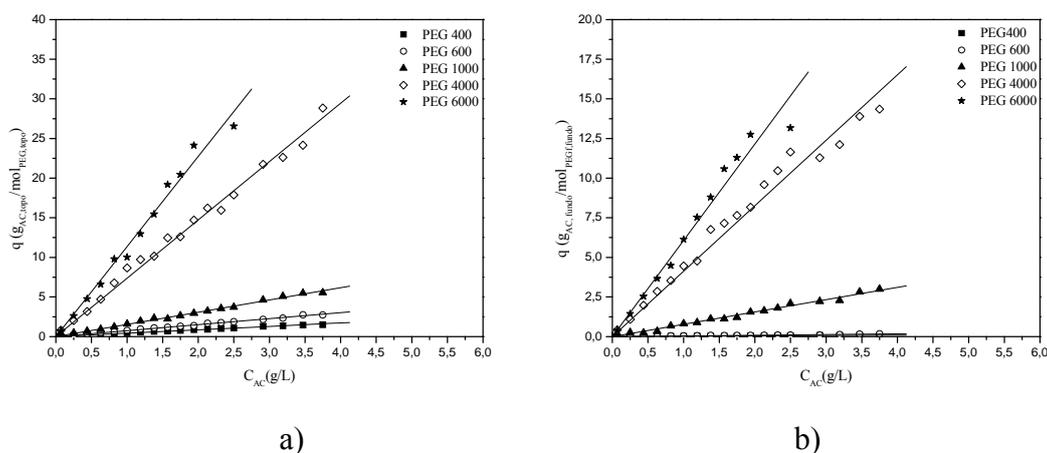


Figura 4.66. Relação entre o aumento da concentração de AC e quantidade de mol de PEG entre fase de topo e fundo, a temperatura de 25° C. a) Fase de topo; b) Fase de fundo.

Tabela 4.29. Constantes de equilíbrio da interação entre AC, coeficiente de partição e K^0 , para diferentes PEGs.

PEG	Fase de topo	Fase de fundo	R^2	K	K^0
	$K_{eq, topo}$	$K_{eq, fundo}$			
6000	11,36	6,07	0,993	4,8	2,0
4000	7,36	4,13	0,996	4,5	1,6
1000	1,54	0,78	0,998	4,6	2,0
600	0,76	0,04	0,998	15,2	19,0
400	0,43	0,02	0,998	15,6	21,5

4.9. Cinética de hidrólise do AC no S DFA

Nesta etapa foi analisada a velocidade de degradação do AC no S DFA, uma vez que se faz necessário para determinar o tempo de equilíbrio de separação das fases do S DFA. A composição do S DFA foi baseada na otimização realizada anteriormente, sendo que para todos os PEGs foi utilizado a TLL 36 e 1,3 de rTLL. Apesar de que alguns estudos tenham sido realizados por HAGINAKA; NAGAKAWA; UNO (1981), BERSANETTI *et al.* (2005) e SANTOS *et al.* (2009) para determinar a taxa de degradação do AC, nenhum estudo aborda diretamente a degradação do AC presente nas fases de topo e fundo do S DFA.

4.9.1. Degradação do AC proveniente do produto farmacêutico Clavulin® no S DFA

A estabilidade do AC proveniente do produto farmacêutico Clavulin® para pHs entre 5,4 a 8 na fase de topo e fundo do S DFA para os PEGs 6000, 4000, 1000, 600 e 400 estão ilustradas nas Figura 4.67 a 4.71. Os resultados mostram que o processo de degradação do AC no S DFA obedece a cinética pseudo-primeira ordem apresentando na Equação 2.1. Pode-se observar que a velocidade de degradação do AC aumenta com aumento do pH, para todos os PEGs. O mesmo comportamento pode ser observado para a velocidade de degradação do AC na fase de fundo para todos os S DFA avaliados. Normalmente após a formação das fases do S DFA o pH da fase de fundo é muito semelhante ao pH da fase de topo. Segundo o trabalho de BERSANETTI *et al.* (2005) faixa de pH de menor velocidade de degradação do AC está entre 5 e 7, no entanto, para S DFA é observado um aumento da velocidade de degradação do AC dentro desta faixa de pH estudada (Figura 4.67 a 4.71).

As constantes de velocidade de degradação, k_2 , foram estimadas por regressão linear dos dados experimentais e podem se observadas na Tabela 4.30, tanto para a fase de topo como para a fase de fundo. Comparando os valores de k_2 , entre fase de topo e fundo, nota-se que a constante de degradação da fase de fundo é de 3,8 a 16,8 vezes superiores à fase de topo. A degradação do AC presente na fase de fundo ocorre em sua totalidade dentro de 9 h após a separação das fases para o PEGs 6000 e 4000. Para os PEGs de menores massas molares (1000, 600, 400) a degradação do AC em pH 8 ocorreu na sua totalidade num período inferior a 1 h impossibilitando a sua determinação. Esta alta velocidade de degradação está relacionada à menor quantidade de PEG presente na fase de fundo após a formação das fases para todos os PEGs, uma vez que, a fase de fundo é constituída entre 68 a 78% em massa de água, 18 a 25% de fosfato e 4 a 5% de PEG. Este fato faz com que a hidrólise do AC seja mais rápida na fase de fundo. Em contrapartida, a fase de topo é constituída de 29,5 a 51% em massa de água, 4,5 a 9% de fosfato e 25 a 40% de PEG.

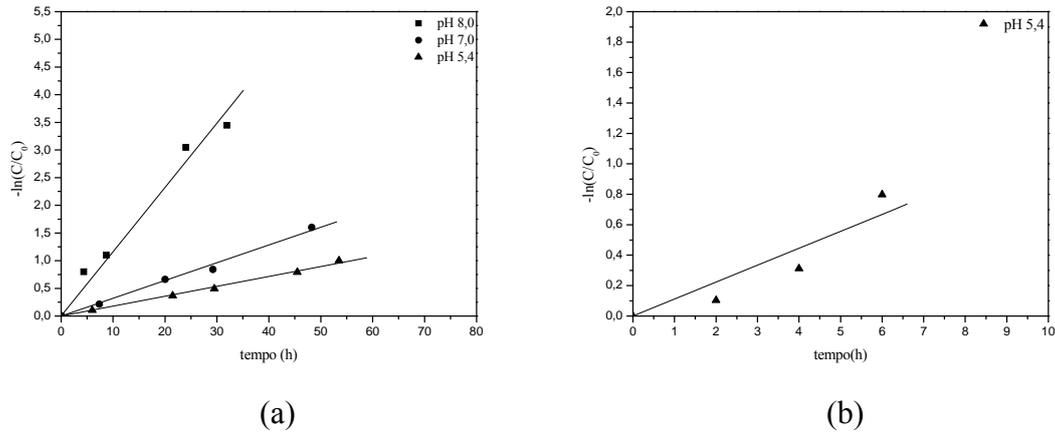


Figura 4.67. Hidrólise do AC proveniente do produto farmacêutico Clavulin[®] para o PEG 400, a temperatura de 20° C e diferentes pHs: a) Fase de topo; b) Fase de fundo.

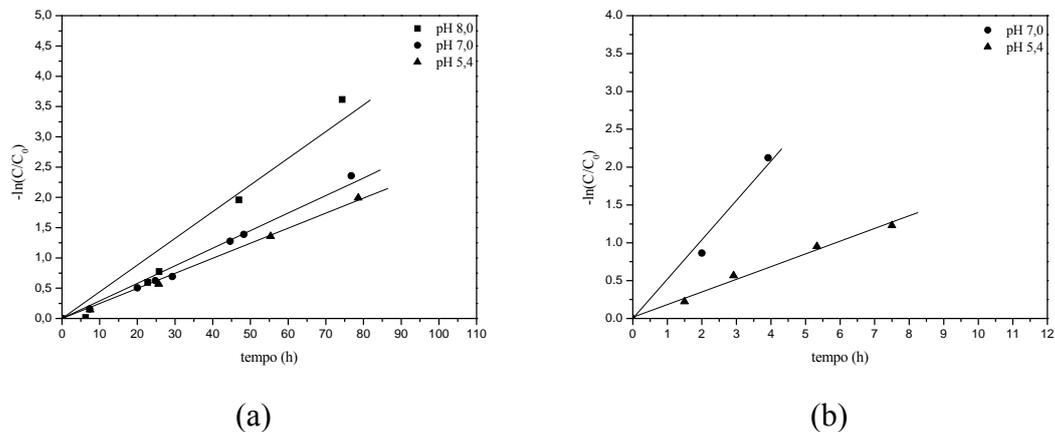


Figura 4.68. Hidrólise do AC proveniente do produto farmacêutico Clavulin[®] para o PEG 600, a temperatura de 20° C e diferentes pHs: a) Fase de topo; b) Fase de fundo.

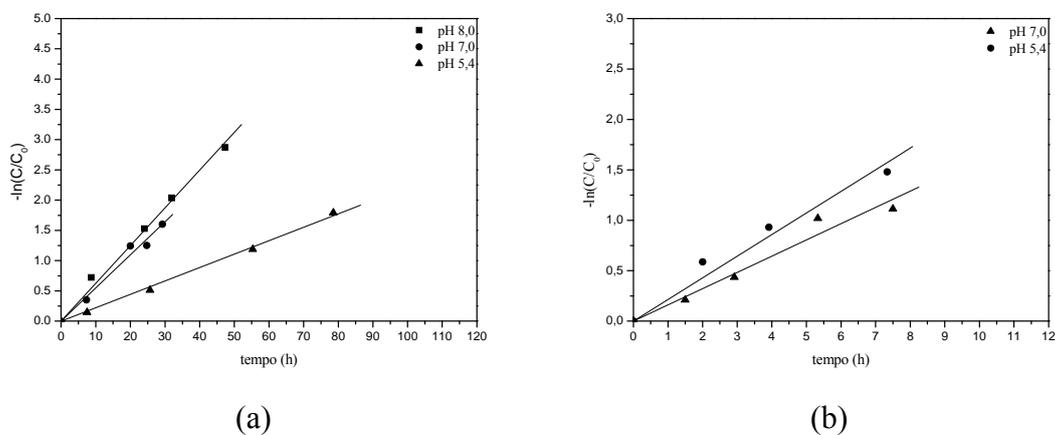


Figura 4.69. Hidrólise do AC proveniente do produto farmacêutico Clavulin[®] para o PEG 1000, a temperatura de 20° C e diferentes pHs: a) Fase de topo; b) Fase de fundo.

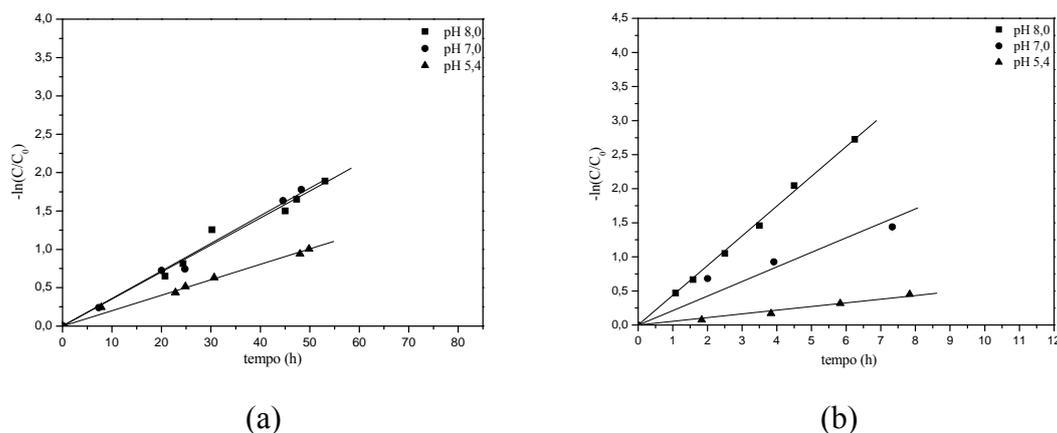


Figura 4.70. Hidrólise do AC proveniente do produto farmacêutico Clavulin® para o PEG 4000, a temperatura de 20° C e diferentes pHs: a) Fase de topo; b) Fase de fundo.

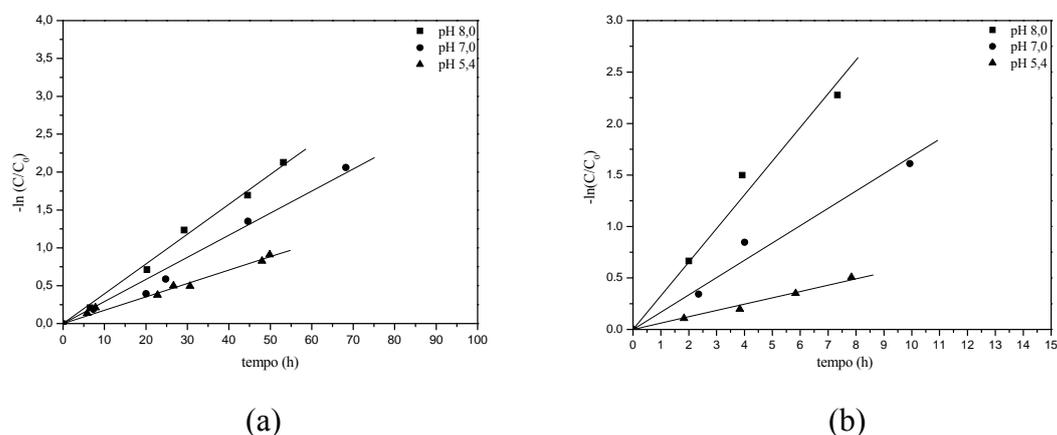


Figura 4.71. Hidrólise do AC proveniente do produto farmacêutico Clavulin® para o PEG 6000, a temperatura de 20° C e diferentes pHs: a) Fase de topo; b) Fase de fundo.

O fato da maior massa molecular de PEG apresentar uma menor taxa de degradação deve estar relacionado ao fato de uma maior interação entre AC e o PEG, sendo que esta proporciona uma maior estabilidade à molécula do AC como se observa na Tabela 4.30.

A Figura 4.72 representa a comparação das taxas de degradação obtida por BERSANETTI *et al.* (2005), na temperatura de 20° C e solução com força iônica de 0,5 M, e das taxas de degradação das fases de topo dos SDFAs obtidas neste trabalho. Nota-se que as taxas de degradação nas fases de topo dos SDFAs são superiores as obtidas por BERSANETTI *et al.* (2005). Considerando que a força iônica da solução da fase de topo dos SDFAs se encontra na faixa entre 0,78 e 1,55 M, as taxas de degradações obtidas foram próximas a região de menores instabilidades do AC para ambos os PEGs.

Estes resultados concordam parcialmente com os resultados obtidos por SANTOS *et al.* (2009) que constataram que a força iônica para um determinado sal, exerce uma baixa influência na taxa de reação de hidrólise do AC. No entanto, a comparação é dificultada, uma vez que a degradação do AC é muito influenciada por várias condições como os sais do tampão utilizados para manter constante o pH (BERSANETTI *et al.*, 2005, SANTOS *et al.*, 2009).

Tabela 4.30. Constante de degradação do AC proveniente do produto farmacêutico Clavulin[®] no SDFA, a temperatura de 20° C.

PEG	pH	Fase de topo		Fase de fundo	
		k_2 (h ⁻¹)	R ² (-)	k_2 (h ⁻¹)	R ² (-)
6000	8	0,038	0,997	0,315	0,991
6000	7	0,029	0,993	0,161	0,988
6000	5,4	0,017	0,993	0,064	0,994
4000	8	0,035	0,990	0,437	0,999
4000	7	0,037	0,996	0,187	0,974
4000	5,4	0,019	0,991	0,083	0,986
1000	8	0,063	0,998	*	*
1000	7	0,055	0,991	0,197	0,989
1000	5,4	0,023	0,993	0,161	0,981
600	8	0,051	0,989	*	*
600	7	0,032	0,995	0,547	0,994
600	5,4	0,026	0,999	0,168	0,995
400	8	0,109	0,991	*	*
400	7	0,041	0,990	*	*
400	5,4	0,025	0,998	0,111	0,950

(*) Degradação do AC num período inferior a 1 h.

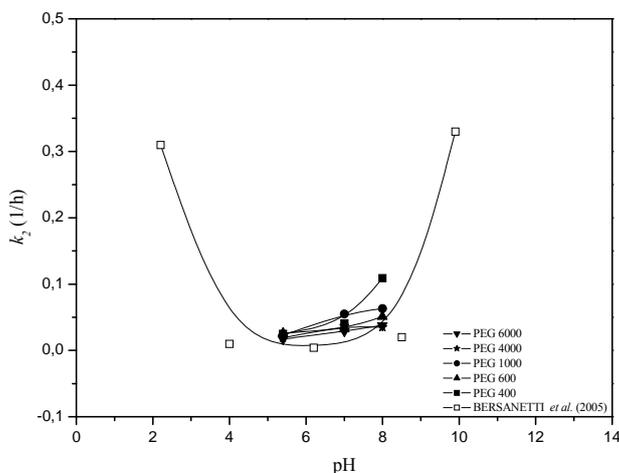


Figura 4.72. Efeito do pH na constante de degradação do AC proveniente do produto farmacêutico Clavulin[®] no SDFA, a temperatura de 20° C em comparação com os resultados obtidos por BERSANETTI *et al.* (2005).

4.9.2. Degradação de AC proveniente do caldo fermentado por *Streptomyces clavuligerus* no SDFA

Para o estudo da hidrólise do AC proveniente do meio fermentado foi utilizado caldo pré-tratado com membrana de MF de 0,2 μm e posteriormente com a membrana de UF de 3 kDa. As Figuras 4.73 a 4.77 mostram o resultados experimentais da degradação do AC presente no caldo de fermentação para os PEGs 6000, 4000, 1000 600 e 400 nas fases de topo e fundo do SDFA. Na Tabela 4.31 podem se observar os valores obtidos para constantes de velocidades, k_2 . Estes foram próximos aos resultados obtidos para o AC proveniente da solução de Clavulin[®] para ambos PEGs que estão representados na Tabela 4.30. Comportamento este também observado para a fase de fundo (Tabela 4.32). A degradação total do AC na fase de fundo do PEG 400 ocorreu em um tempo inferior a 1 h para os pHs 7 e 8, impossibilitando a determinação da velocidade de degradação.

No entanto, pode-se observar em alguns casos como nas fases de topo dos PEGs 6000 e 400 e fases de fundo dos PEGs 600 e 1000 que as constantes de degradação do AC para pHs 7 e 5,4 foram muito próximas (Tabela 4.31). Este fato pode ser explicado pela presença de alguns componentes no meio fermentativo, como compostos de amônia, que aumentam a instabilidade do AC, e estes compostos podem ter a sua maior distribuição na fase de topo ou fundo em função do PEG e pH do SDFA.

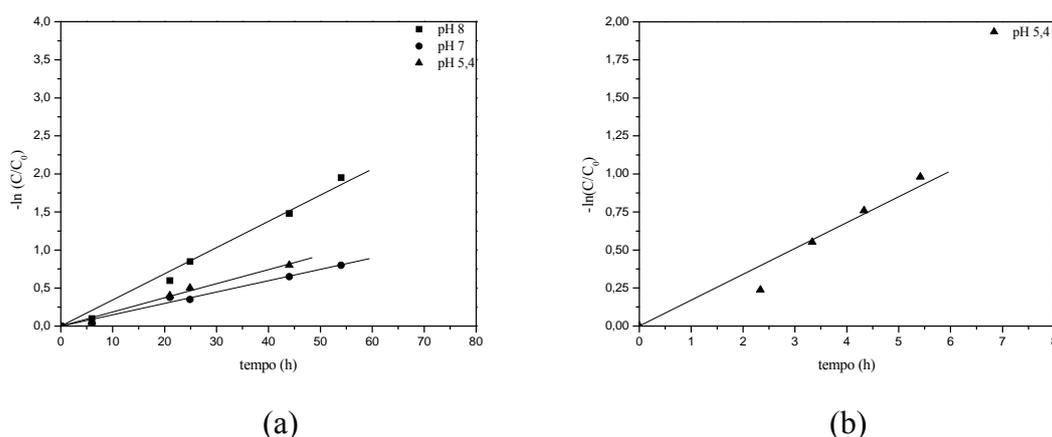
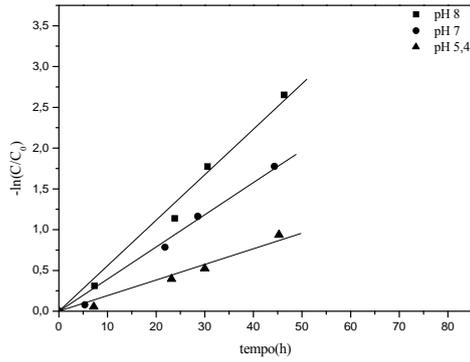
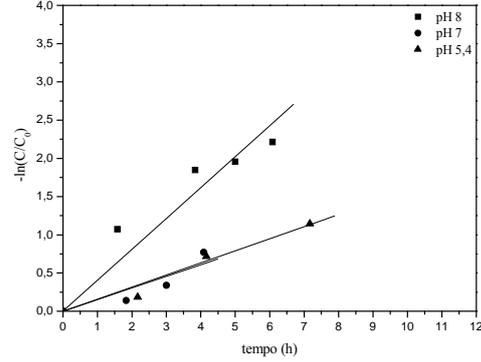


Figura 4.73. Hidrólise do AC proveniente do caldo pré-tratado para o PEG 400, a temperatura de 20° C e diferentes pHs: a) Fase de topo; b) Fase de fundo.

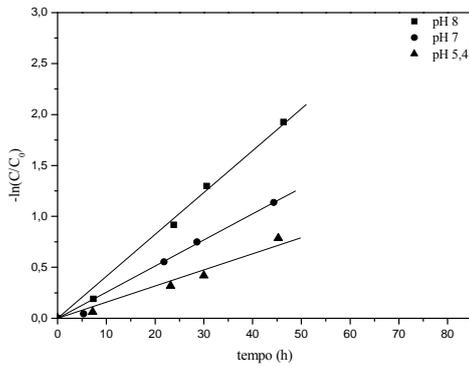


(a)

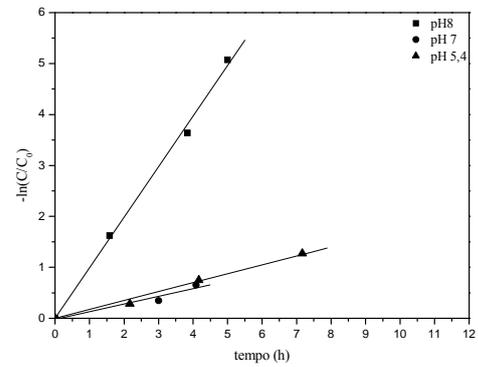


(b)

Figura 4.74. Hidrólise do AC proveniente caldo pré-tratado para o PEG 600, a temperatura de 20° C e diferentes pHs: a) Fase de topo; b) Fase de fundo.

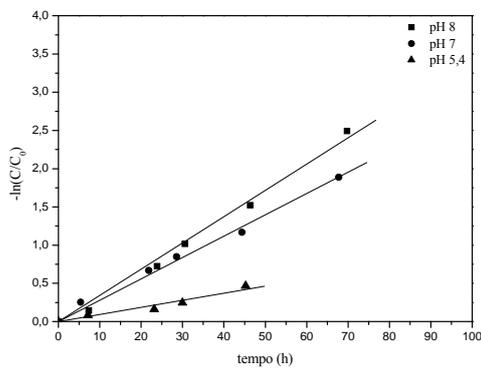


(a)

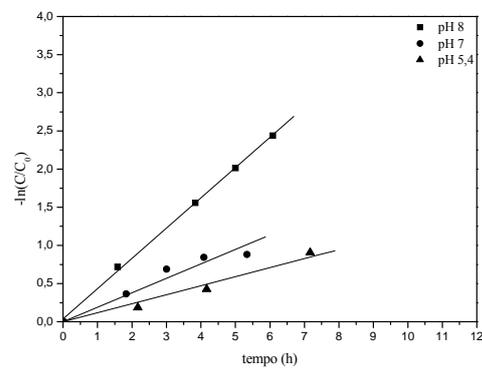


(b)

Figura 4.75. Hidrólise do AC proveniente do caldo pré-tratado para o PEG 1000, a temperatura de 20° C e diferentes pHs: a) Fase de topo; b) Fase de fundo.



(a)



(b)

Figura 4.76. Hidrólise do AC proveniente do caldo pré-tratado para o PEG 4000, na temperatura de 20° C e diferentes pHs: a) Fase de topo; b) Fase de fundo.

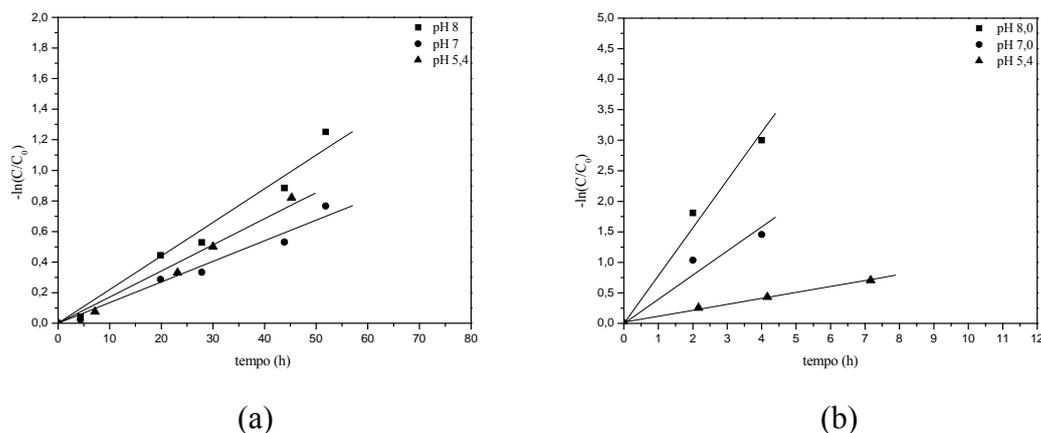


Figura 4.77. Hidrólise do AC proveniente do caldo pré-tratado para o PEG 6000, a temperatura de 20° C e diferentes pHs: a) Fase de topo; b) Fase de fundo.

A velocidade de degradação do AC proveniente do caldo pré-tratado na fase de topo em comparação aos resultados obtidos por BERSANETTI *et al.* (2005) apresentaram comportamento semelhante ao observado no Item 4.9.1, como pode se observar na Figura 4.78, indicando que a origem do AC para este caso não demonstrou uma influência significativa na taxa de degradação do AC na fase de topo do SDFA.

Tabela 4.31. Constante de degradação do AC proveniente do meio fermentado *Streptomyces clavuligerus* em SDFA, a temperatura de 20° C.

PEG	pH	Fase de topo		Fase de fundo	
		k_2 (h ⁻¹)	R ² (-)	k_2 (h ⁻¹)	R ² (-)
6000	8	0,022	0,990	0,750	0,993
6000	7	0,015	0,988	0,364	0,971
6000	5,4	0,017	0,991	0,098	0,998
4000	8	0,036	0,998	0,397	0,999
4000	7	0,027	0,997	0,190	0,971
4000	5,4	0,010	0,977	0,118	0,990
1000	8	0,041	0,993	0,993	0,999
1000	7	0,025	0,996	0,151	0,974
1000	5,4	0,016	0,989	0,174	0,996
600	8	0,056	0,995	0,404	0,964
600	7	0,039	0,995	0,152	0,929
600	5,4	0,019	0,991	0,158	0,985
400	8	0,036	0,992	*	*
400	7	0,015	0,990	*	*
400	5,4	0,018	0,990	0,170	0,980

(*) Degradação do AC num período inferior a 1h.

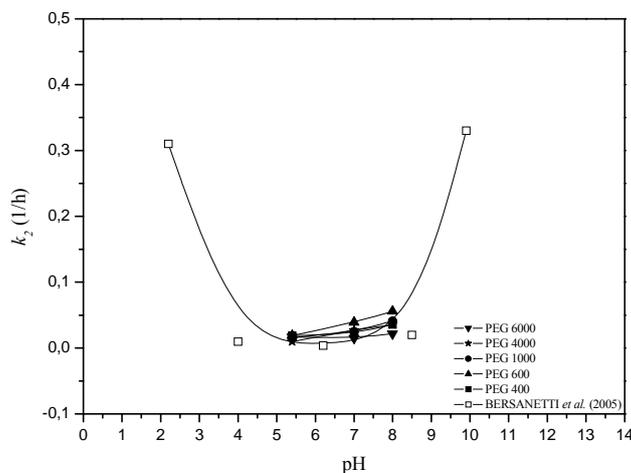


Figura 4.78. Efeito do pH na constante de degradação do AC proveniente do caldo pré-tratado no SDFa, a temperatura de 20° C em comparação com os resultados obtidos por BERSANETTI *et al.* (2005).

4.9.3. Conclusões das etapas de análise da variação da concentração e degradação do AC na extração por SDFa

Como conclusões revelantes das etapas de análise da variação da concentração e degradação do AC na extração por sistema de duas fases aquosas se podem dizer que:

4.9.3.1. Conclusões da análise da variação da concentração do AC na extração por SDFa

1. Neste estudo foi demonstrado que apesar de que a redução da massa molecular do PEG ter favorecido o coeficiente de partição do AC, quando se analisa a relação massa de PEG e massa de AC presentes no topo e fundo do SDFa, o AC apresenta uma maior afinidade com PEGs de maior massa molecular.

2. A relação entre o aumento da concentração inicial de AC na amostra com a concentração no topo e fundo do SDFa tem o comportamento linear.

3. A variação na concentração inicial do AC em SDFA com a composição definida não proporciona variações significativas nos resultados dos coeficientes de partição do AC.

4.9.3.2. Conclusões da análise da degradação do AC na extração por SDFA

1. A hidrólise do AC na presença do PEG comporta-se como uma reação de pseudo-primeira ordem tanto para fase de topo e fundo independente da origem do AC, proveniente de caldo ou produto farmacêutico Clavulin®.

2. A menor taxa de degradação foi observada para o AC proveniente de caldo na fase de topo do SDFA para o PEG 6000 em pH 5,4. De modo geral ocorre um decréscimo na taxa de degradação do AC do PEG 400 para 6000 e pH 8 para 5,4, para a fase de topo do SDFA.

3. A taxa de degradação do AC na fase de fundo é cerca de 4 vezes superior a fase de topo do SDFA. Para os PEGs de menores massas moleculares (400, 600 e 1000) e pH 8 com AC proveniente do produto farmacêutico Clavulin® a degradação do AC ocorre na sua totalidade numa intervalo de tempo inferior a 1 h nas condições estudadas.

4.10. Extração do AC em processo contínuo de SDFA

Nesta etapa final do trabalho foi avaliada a possibilidade da extração do AC em processo contínuo do SDFA a partir da solução do produto farmacêutico Clavulin® e de caldo pré-tratado pela membrana UF de 3 kDa. O sistema contínuo foi baseado nos trabalhos realizados por MISTRY *et al.* (1996) e SIMON; GAUTAM (2004). As condições do SDFAs utilizadas para sistema contínuo foram às obtidas através da otimização do SDFA para o AC em processo em batelada: PEG 400, pH 6,4, TLL 42 e rTLL 1,3. Devido às condições do SDFA e às limitações do conjunto de bombas, o sistema contínuo foi conduzido em duas vazões diferentes de entrada de caldo 1,6 mL/min e 4 mL/min. Nas Figuras 4.79 a 4.81 pode se observar os resultados obtidos pelo processo contínuo do SDFA na extração do AC utilizando uma solução do produto farmacêutico Clavulin®, com a concentração de AC de 500 mg/L.

A Figura 4.79 pode se observar o comportamento do coeficiente de partição longo do tempo para o processo contínuo de SDFA. Inicialmente o processo contínuo de SDFA para extração do AC apresenta instabilidade durante primeiros 15 minutos, principalmente para o sistema com vazão de 6,4 mL/min onde foi verificado nesta vazão o aparecimento de uma região de dispersão do SDFA no separador de duas fases. Partindo do pré-suposto que a mistura no tanque seja perfeita, esta região de dispersão no separador contribuiu para instabilidade do SDFA, no entanto com o tempo o sistema tende-se a estabilizar.

A variação da concentração de PEG e do sal de fosfato na fase de topo e fundo durante a etapa experimental do processo contínuo pode se observada nas Figuras 4.80 e 4.81. Nota-se que há oscilações na composição das fases indicando a instabilidade do sistema, no entanto, estas oscilações não afetam diretamente o coeficiente de partição. O aumento 4 vezes na vazão de 1,6 mL/min para 6,4 mL/min não influenciou na estabilidade da composição do sistema ao longo do tempo. No entanto, é possível notar que as concentrações de PEG e fosfato foram alterados, esta alteração deve estar relacionada ao fato que, apesar da velocidade de separação para formação das fases serem rápida, o sistema ainda não atingiu o equilíbrio químico das fases (Figuras 4.80 e 4.81).

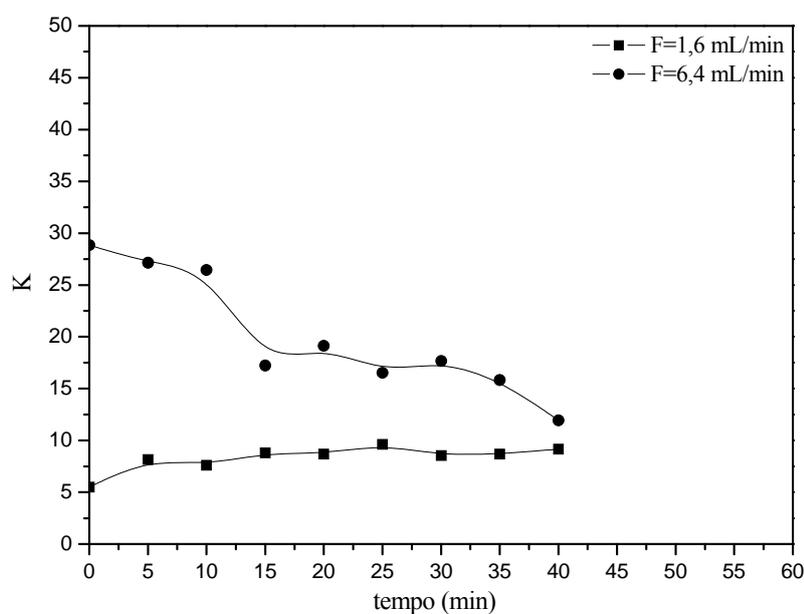


Figura 4.79. Coeficiente de partição do AC para SDFA em processo contínuo com o AC proveniente do Clavulin[®].

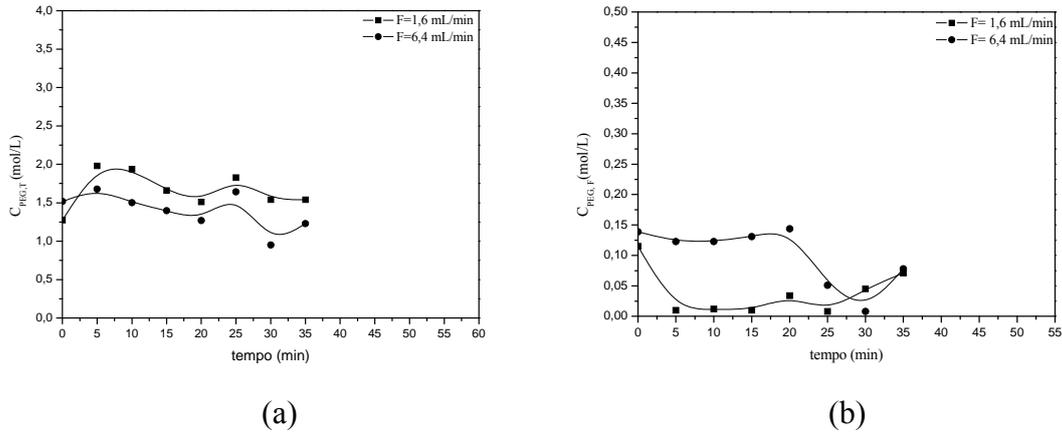


Figura 4.80. Concentração de PEG na fase de topo e fundo para o processo contínuo de S DFA na extração de AC da solução de Clavulin[®]: a) Fase de topo; b) Fase de fundo.

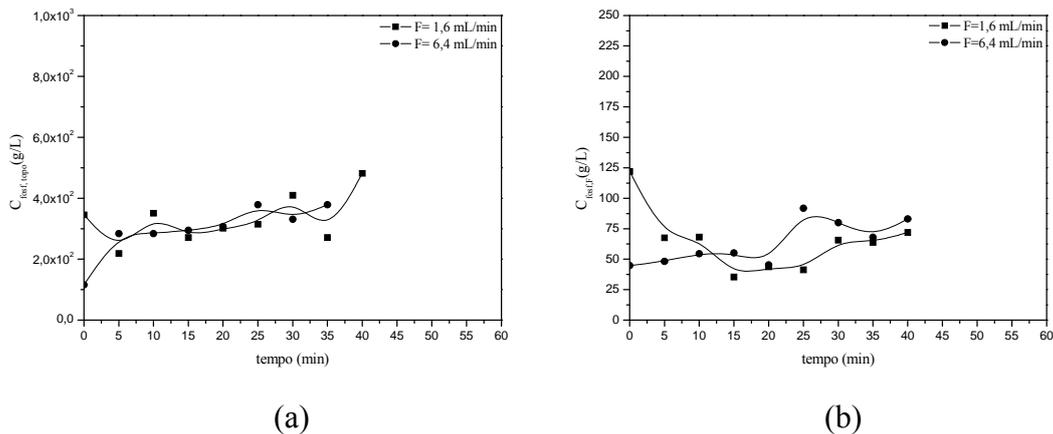
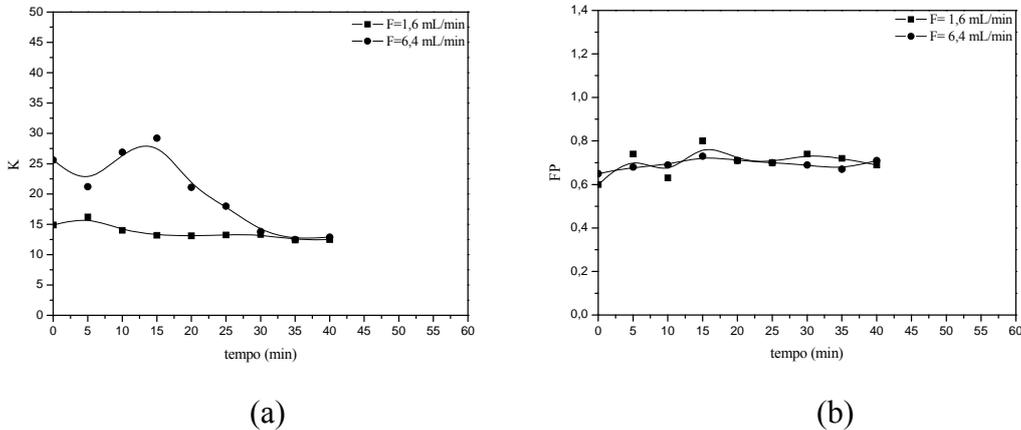


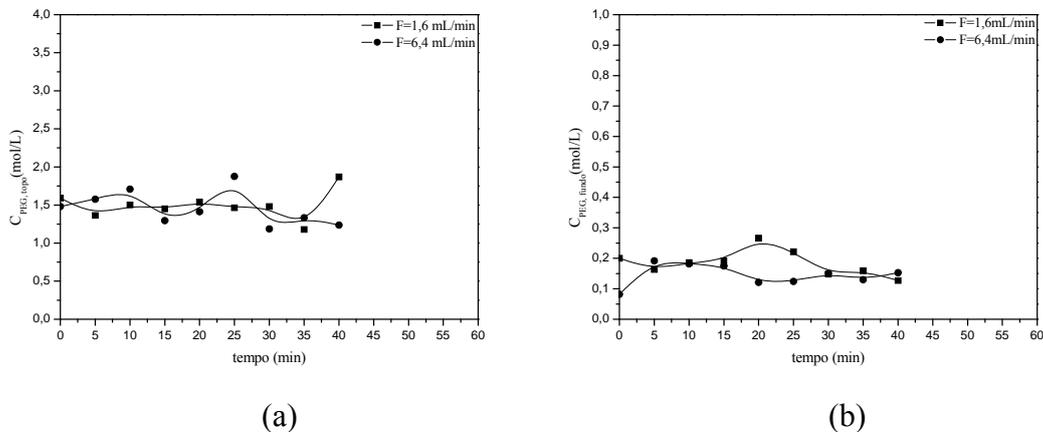
Figura 4.81. Concentração de sal de fosfato na fase de topo e fundo para o processo contínuo de S DFA na extração de AC da solução de Clavulin[®]: a) Fase de topo; b) Fase de fundo.

As Figuras 4.82 a 4.84 mostram os resultados obtidos no processo de S DFA contínuo no AC proveniente do caldo pré-tratado com concentração de AC de 470 mg/L, além do coeficiente de partição, o desempenho do processo de separação foi avaliado pelo fator de purificação. O coeficiente de partição e a concentração de PEG e o sal fosfato tiveram comportamento semelhantes, sendo que para coeficiente de partição é observado um aumento inicial e posteriormente um decréscimo para o experimento com vazão de entrada de 6,4 mL/min (Figura 4.82a). No entanto, o fator de purificação para ambas as vazões se manteve próximo de 0,74 como mostra a Figura 4.82b. Em relação à concentração de PEG e sal de fosfato no topo e fundo a mesma

oscilação nas concentrações foram observadas quando utilizado a solução de AC proveniente do Clavulin[®] (Figura 4.82 e 4.83). Vale ressaltar que o tempo de 40 minutos de duração dos experimentos segundo o trabalho de SIMON; GAUTAM (2004) corresponde uma região de instabilidade do processo contínuo do S DFA.



(a) (b)
 Figura 4.82. Variação do K e FP para o processo contínuo caldo de AC em relação ao tempo.



(a) (b)
 Figura 4.83. Concentração de PEG na fase de topo e fundo para o processo contínuo de S DFA na extração de AC do caldo pré-tratado: a) Fase de topo; b) Fase de fundo.

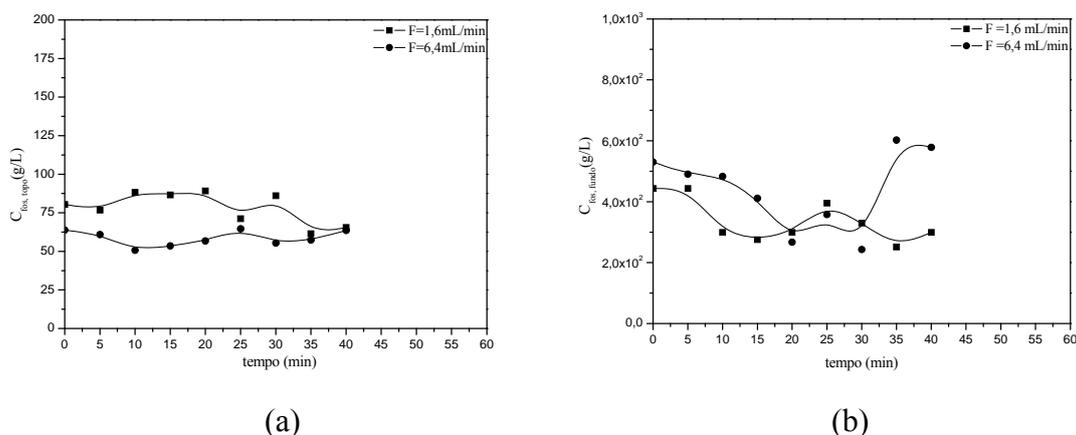


Figura 4.84. Concentração de sal de fosfato na fase de topo e fundo para o processo contínuo de SDFA na extração de AC do caldo pré-tratado: a) Fase de topo; b) Fase de fundo.

Na Tabela 4.32 se observa os valores de K e FP , juntamente com os valores obtidos das concentrações de AC nas fases de topo e de fundo. Os resultados obtidos demonstram que o coeficiente de partição é próximo à prevista pela otimização. Apesar de que o fator de purificação é reduzido pela metade, indicando a redução da eficiência do SDFA na purificação extração do AC no processo contínuo. Este fato indica que o comportamento dinâmico deste sistema tem que ser mais bem avaliado, para que se possam obter melhorias operacionais e de configurações.

Tabela 4.32. Condições operacionais e dados experimentais dos SDFA em processo contínuo e batelada.

Solução	Fluxo (mL/min)	K (-)	FP (mg/L)	$C_{AC, topo}$ (mg/L)	$C_{AC, fundo}$ (mg/L)
Clavulin [®]	1,6	8,6	-	123,2	14,3
	6,4	17,6	-	117,5	6,7
Caldo	1,6	13,2	0,74	95,7	7,3
	6,4	13,1	0,73	103,7	7,9
Otimização	Batelada	13,0	1,5	-	-

4.10.1. Conclusões da etapa da extração do AC em processo contínuo de S DFA

Como conclusões revelantes da etapa da extração do AC em processo contínuo de S DFA se podem dizer que:

1. A extração contínua do AC proveniente do produto farmacêutico Clavulin® pelo S DFA conduzida nas condições previstas pela otimização, obteve o coeficiente de partição do AC próximo à prevista pelo modelo obtido pela otimização.

2. O aumento da vazão de entrada de 4 vezes (1,6 para 6,4 mL/min) não ocasiona uma mudança significativa na composição das fases e o sistema se mantém estável.

3. Para o sistema contínuo de S DFA para extração do AC proveniente de caldo pré-tratado com membrana de UF de 3 kDa foi demonstrado que, apesar de se obter coeficiente de partição próximo o prevista pelo modelo obtido na otimização do S DFA, o fator de purificação foi reduzido pela metade, indicando que este necessita de uma melhor avaliação nas condições operacionais do sistema contínuo do S DFA para extração e purificação do AC.

5. Conclusão geral do trabalho

Como conclusão final do trabalho pode se dizer que os resultados obtidos durante a realização deste trabalho são importantes para a definição de um processo descontínuo e principalmente para o processo contínuo, uma vez que, o processo de purificação utilizando SDFA, quando operado continuamente, pode ser integrado a operações de purificação precedida pela ultrafiltração ou mesmo as posteriores como a troca iônica ou reações de precipitação. Analisando-se todas as etapas estudadas e os resultados obtidos durante a realização desta tese, pode se definir como sequência de extração e purificação do AC, sendo como primeira etapa de extração a utilização da membrana de MF de tamanho de poro 0,2 μm , pressão transmembrana de 98 kPa, a temperatura de 11° C e vazão de alimentação de 21,6 L.h⁻¹. Como segunda etapa a utilização da membrana de UF de 50 kDa, a temperatura de 20° C, vazão de alimentação de 21,6 L.h⁻¹ e pressão transmembrana de 80 kPa. Para a terceira etapa a utilização do SDFA com as seguintes condições: PEG 400, pH 6,4, TLL 42 e rTLL 1,3. Após a precipitação dos sais da fase de topo do SDFA por etanol, a utilização da resina Streamline Q XL para re-extração da fase de topo, concentração e a purificação do AC.

6. SUGESTÕES

Para os futuros trabalhos que venham a ser desenvolvido sobre a purificação do AC são propostas as seguintes sugestões:

6.1. Filtração

1. Analisar a cinética da formação da camada de gel nas membranas de MF e UF tendo dois caldos com a composição diferentes e pré-definidos, para melhor entendimento do fenômeno.

2. Avaliar o uso da diafiltração na filtração por membrana de MF, para a retirada de células do caldo pós-fermentação, objetivando o aumento do fluxo de permeado e uma maior recuperação do AC.

3. Analisar a influência do pH no fluxo de permeado para as membranas de MF e UF.

4. Otimizar o processo de filtração com membranas de UF tendo como variáveis pH, temperatura e vazão, para que possa determinar as melhores condições de filtração do caldo pré-tratado pela membrana de UF.

6.2. Processo de troca iônica

1. Estudar a eficiência da resina de troca iônica Streamline Q XL através dos números de ciclos de adsorção e dessorção, sem utilizar o procedimento de regeneração da resina, uma vez que, o processo de regeneração da resina é oneroso.

2. Reavaliar as curvas de equilíbrio de adsorção do AC pela resina Streamline Q XL e para que se possa definir com clareza o fenômeno e um modelo que descreva o processo.

3. Analisar a utilização da resina troca iônica Streamline Q XL em processo contínuo de adsorção na purificação do AC.

4. Testar outras resinas aniônicas ANX FF e DEAE FF como possíveis resinas a serem utilizadas na purificação do AC.

6.3. Sistema de duas fases aquosas

1. Estudar a extração e purificação do AC com o PEG 300 e 200, pois são PEGs de menores viscosidades e assim contribuindo para um sistema contínuo.
2. Analisar a purificação do AC em relação aos aminoácidos e peptídeos utilizando SDFa com os PEGs de menores massa moleculares.
3. Estudar outras composições de SDFa composta por PEG e sais como Na_2SO_4 , $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ e MgSO_4 .
4. Estudar o número de estágios viáveis para purificação AC utilizando SDFa para se obter um alto fator de purificação.
5. Estudar novas configurações para o processo contínuo de extração de AC por SDFa, como por exemplo, utilização de separadores horizontais.
6. Analisar a influência da região de dispersão formada no processo contínuo do SDFa na de extração do AC.

6.4. Re-extração do AC fase de topo do SDFa

1. Estudar a precipitação do sal da fase de topo do SDFa, para que este possibilite uma maior eficiência na re-extração do AC por troca iônica.
2. Utilizar outra técnica cromatográfica para re-extração do AC, como por exemplo, cromatografia de exclusão.
3. Estudar a integração dos processos SDFa, precipitação e troca iônica propondo um sistema contínuo de re-extração do AC da fase de topo rica em PEG.
4. Analisar o rendimento e a purificação do AC envolvendo todos os processos filtração, SDFa, precipitação e re-extração em sistema contínuo.
5. Analisar a reciclagem dos materiais como PEG e sal após re-extração do AC da fase de topo do SDFa, tendo assim, não só a redução dos custos, mas também impacto ambiental.

7. LISTA DE PUBLICAÇÕES

SILVA, C. S.; JACINTO, J. S.; CASTRO, S. A.; HOKKA, C. O.; BARBOZA, M. Aspectos Gerais da Microfiltração e Ultrafiltração na Separação de Ácido Clavulânico de Caldos e Fermentação In: XVI Simpósio Nacional de Bioprocessos (SINAFERM) 2007, Curitiba-Pr. Anais (CD-ROM).

SILVA, C. S.; BARRETO, V.; YOUSSEF RODRIGUEZ, G.; HOKKA, C. O, BARBOZA, M. Recovery of clavulanic acid from an aqueous two-phase system by ion-exchange resin. Book of Abstracts II International Conference on Environmental, Industrial and Applied Microbiology (BioMicroWorld) -2007. p.720, Seville (Spain).

SILVA, C. S.; YOUSSEF RODRIGUEZ, G.; HOKKA, C. O, BARBOZA, M. Studies on Fouling Index in Tangential Filtration Applied for Separation of Clavulanic Acid from Fermentation Broths. Book of Abstracts II International Conference on Environmental, Industrial and Applied Microbiology (BioMicroWorld) -2007. p.721, Seville (Spain).

PATENTE PI0704995-1: PASOTTO, M. B.; HOKKA, C. O; BADINO, A.C.; SILVA, C. S.; YOUSSEF RODRIGUEZ, G.; BARRETO, V. O. TEODORO; J.C.; OLIVEIRA, J. H. O. L. Processo para extração e purificação de ácido clavulânico seus sais e ésteres. 2007.

HOKKA, C. O.; SILVA, CLOVIS SACARDO; BOVAROTTI, E.; RODRIGUES, MARIA ISABEL; BARBOZA, M. Avaliação de efeitos de parâmetros envolvidos na purificação do ácido clavulânico através dos sistemas de duas fases aquosas. In: XVII congresso brasileiro de engenharia química, 2008, Recife. XVII COBEQ, 2008.

SILVA, C. S.; BARRETO, V. O.; CASELLA, T. S.; BARBOZA, M. Efeito da precipitação dos sais de fosfato da fase topo do sistema de duas fases aquosas na re-extração de ácido clavulânico por troca iônica. In: Congresso Latino-Americano de Cromatografia e Técnicas Relacionadas COLACRO XII-2008, 2008, Florianópolis. COLACRO XII-2008, 2008.

SILVA, C S.; KODAMA, E.; BARBOZA, M. Estudo da influência da filtração por membranas no processo de purificação do ácido clavulânico por troca iônica. In: Congresso Latino-Americano de Cromatografia e Técnicas Relacionadas COLACRO XII-2008, 2008, Florianópolis. COLACRO XII-2008, 2008.

INNOCENTINI, M. D. M.; MELONI, R.V.; SILVA, CLOVIS SACARDO; RODRIGUES, G.Y.; HOKKA, C. O.; BARBOZA, M. Permeability analysis of membranes for tangencial microfiltration. In: Euromembrane 2009, Montpellier. The EMS Conference, 2009, p. 367.

SILVA, C. S.; BOVAROTTI, E.; RODRIGUES, M. I.; HOKKA C. O.; BARBOZA, M. Evaluation of the effects of the parameters involved in the purification of clavulanic acid from fermentation broth by aqueous two-phase systems. *Bioprocess Biosystem Engineering*, v.32, p.625-632, 2009.

BARBOZA, M. ; SILVA, C.; CUEL, M.; BARRETO, V.; HOKKA, C.O. Separation of clavulanic acid from fermented broth of amino acids by an aqueous two-phase system and ion exchange adsorption. In: 14th European Congress on Biotechnology, 2009, Barcelona. Abstracts of the 14th European Congress on Biotechnology - New Biotechnology, v. 24, p.181.

SILVA, CLOVIS SACARDO; BARROS, M.A.C.D.; HOKKA, CARLOS OSAMU; BARBOZA, MARLEI. Clavulanic Acid Degradation in an Aqueous Two Phase System. In: III International Conference on Environmental, Industrial and Applied Microbiology, 2009, Lisboa. *Biomicroworld 2009*, 2009.

RODRIGUEZ, G. Y.; SILVA, CLOVIS SACARDO; HOKKA, C. O.; BARBOZA, M. Extraction of clavulanic acid in aqueous two-phase systems followed by separation through ultrafiltration. In: III International Conference on Environmental, Industrial and Applied Microbiology, 2009, Lisboa. *Biomicroworld 2009*, 2009

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERTSSON, P. A. Partition of cell particles and macromolecules. 3^a ed. New York, John Wiley & Sons, p.346, 1986.

ALBERTSSON, P. A.; JOHANSSON, G.; TJERNELD, F. Aqueous two-phase separations in: ASENJO, J. A. Separation Processes in biotechnology, 1^a ed. New York, Marcel Dekker, v.9, p.287-328, 1990.

ALMEIDA, R. M. R. G. Estudo da purificação do ácido clavulânico utilizando processo contínuo de adsorção. São Carlos, DEQ-UFSCar, 2003. (Tese de Doutorado).

ALVES, A. M.; MORÃO, A.; CARDOSO, J. P. Isolation of antibiotics from industrial fermentation broths using membrane technology. Desalination, v.148, p.181-186, 2002.

BARBOZA, M.; ALMEIDA, R. M. R. G.; HOKKA, C.O. Kinetic studies of clavulânico acid recovery by ion exchange. Bioseparation, v.10, p.221-227, 2002a

BARBOZA, M.; ALMEIDA, R. M. R. G.; HOKKA, C.O. Intrinsic kinetic parameters of clavulânico acid adsorption by ion-exchange chromatography. Industrial of Engineering and Chemical Research. v.41, p. 5789-5793, 2002b.

BARBOZA, M.; ALMEIDA, R. M. R. G.; HOKKA, C.O. Influence of temperature on the kinetics of adsorption and desorption of clavulanic acid by ionic exchange. Biochemical Engineering Journal, v.14, p.19-26, 2003.

BATISTA-NETO, A.; HIRATA, D. B.; CASSIANO FILHO, L. C. M.; BELLÃO, C.; BADINO JÚNIOR; A. C.; HOKKA, C. O. A study on clavulanic acid production by *Streptomyces clavuligerus* in batch, fed-batch and continuous processes. Brazilian Journal of Chemical Engineering, v. 22, p. 557-563, 2005.

BERSANETTI, P. A.; ALMEIDA, R. M. R. G.; BARBOZA, M.; ARAUJO, M. L. G. C.; HOKKA, C. O. Kinetic studies on clavulanic acid degradation. Biochemical Engineering Journal, v.23, p.31-36, 2005.

BIRD, A. E.; BELLIS, J. M.; GASSON, B. C. Spectrophotometric assay of clavulanic acid by reaction with imidazole. *Analytical*, v.107, p.1241-1245, 1982.

BORA, M. M.; BORTHAKUR, S.; RAO, P.C.; DUTTA, N. N. Aqueous two-phase partitioning of cephalosporin antibiotics: effect of solute chemical nature. *Separation and Purification Technology*. v.45, p.153–156, 2005.

BRITES ALVES, A. M., MORÃO, A. CARDOSO, J. P. Isolation of antibiotics from industrial fermentation broths using membrane technology. *Desalination*, v.148, p.181-186, 2002.

BRONSTEIN, V.; MONTE ALEGRE, R. Estudo dos parâmetros da ultrafiltração de permeado de soro de queijo fermentado por *Lactococcus lactis subsp. Lactis*. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v.18, p.1-20, 1998.

BUTTERWORTH, D. Clavulanic acid: properties, biosynthesis, and fermentation. In: Vandame, E. J. *Biotechnology of Industrial Antibiotics*. New York, Marcel Dekker, v.22, p.225-235, 1984.

BUYNAK, J. D., Understanding the longevity of the β -lactam antibiotics and of antibiotic/ β -lactamase inhibitor combinations. *Biochemical Pharmacology*, v.71, p.930-940, 2006.

CARRÈRE, H.; BLASZKOWA, F.; BALMANN, H. R. Modelling the clarification of lactic acid fermentation broths by cross-flow microfiltration. *Journal of Membrane Science*, v.186, p.219-230, 2001.

CHAVES, A. C.; LUCENA-SILVA, ABATH, F. G. C.; PEREIRA, V. R. A., LIMA-FILHO, J. L.; PORTO, A. L. F.; CABRAL, J. M. S. Liquid-liquid extraction of a *Schistosoma mansoni* recombinant protein from an *Escherichia coli* extract in aqueous two-phase system. *Bioprocess Engineering*, v.23, p.435-438, 2000.

COLE, M.; HOWARTH, T. T.; READING, C. (1978). Novel β -lactam antibiotic from *Streptomyces clavuligerus*. Patent Specification 1508977.

COLLINS, C. H. Princípios básicos de cromatografia. In: Collins, C. H.; Braga, G. L.; Bonato, P. S. Fundamentos de cromatografia. 1ª reimpressão Campinas. Editora UNICAMP, p.1-45, 2007

COSTA, S. A.; PESSOA JR., A.; ROBERTO, I. C. Partitioning of xylanolytic complex from *Penicillium janthinellum* by an aqueous two-phase system. Journal of Chromatography B, v.743, p.339-348, 2000.

CUEL, M. F. Modelo matemático do processo de purificação do ácido clavulânico por troca iônica em coluna de leito fixo. São Carlos DEQ-UFSCar, 2009 (Tese).

CUNHA, M. T.; COSTA, M. J. L., CALADO, C. R. C., FONSECA, L. P.; AIRES-BARROS; M. R.; CABRAL, J. M. S. Integration of production and aqueous two-phase systems extraction of extracellular *Fusarium solani pisi cutanise* fusion proteins. Journal of Biotechnology, v.100, p.55-64, 2003.

DIAMOND, A. D.; HSU, J. T. Aqueous two-phase systems for biomolecule separation. Advances in Biochemistry Engineering, v.47, p.89-135, 1992.

DUTTA, M.; BORAH, M. M.; DUTTA, N. N. Adsorptive separation of β -lactam antibiotics: Technology perspectives. Advances in biochemical engineering/biotechnology, v.86, p.255-278, 2004.

ECKERS, C.; CHALKLEY, R.; HASKINS, N.; EDWARDS, J.; GRIFFIN, J.; ELSON, S. Investigatin into the use of derivatization with imidazole for the detection of clavam compounds by liquid chromatography-mass spectrometry. Analytical Communications, v.33, p.215-218, 1996.

ELANDER, R. P., Industrial production of β -lactam antibiotics. Applied Biochemistry and Biotechnology, v.61, p.385-392, 2003.

FERREIRA, G. N. M.; CABRAL, J. M. S.; PRAZERES, D. M. F. Studies on the batch adsorption of plasmid DNA onto anion-exchange chromatographic supports. *Biotechnology Progress*, v.16, p.416-424, 2000.

FOULSTONE, M.; READING, C., Assay of amoxicilin and clavulanic acid, the Components of Augmentin, in *Biological Fluids with High*, 1982.

GAVASANE, M. R.; GAIKAR, V. G. Aqueous two-phase affinity partitioning of *Penicillin acylase* from *E. coli* in presence of PEG-derivatives. *Enzyme and Microbial Technology*, v.32, p.665-675, 2003.

GONZLLEZ-TELLO, P.; CAMACHO, F.; BLLZQUEZ, G. Density and Viscosity of Concentrated Aqueous Solutions of Polyethylene Glycol. *Journal of Chemical and Engineering Data*, v. 40, p. 1168-1171, 1995.

GU, T. Liquid-liquid partitioning methods for bioseparations. In: Ahuja, A., *Handbook of Bioseparations*, New York, Academic Press, New York, v.2, p.329-364, 2000.

GUAN, Y.; LILLEY, T. H.; GARCIA-LISBOA, M. N.; TREFFRY, T. E. New approaches to aqueous polymer systems: Theory, thermodynamics and applications to biomolecular separations. *Pure and Applied Chemistry*, v.67, p.955-962, 1995.

HABERT, A. C.; BORGES, C. P.; NOBREGA, R. *Processos de separação por membranas*. Rio Janeiro, Editora: E-papers Editoriais Ltda, 2006.

HAGINAKA, J.; NAGAKAWA, T.; UNO, T. Stability of clavulanic acid in aqueous solution. *Chemical Pharmaceutical Bulletin*, v.29, p.3334-3341, 1981.

HAMDAOUI, O.; NAFFRECHOUX, E. Modeling of adsorption isotherms of phenol and chlorophenols onto granular activated carbon Part I. Two-parameter models and equations allowing determination of thermodynamic parameters. *Journal of Hazardous Materials*, v.147, p.381-394, 2007.

HARAGUCHI, L.H.; MOHAMEDA, R.S.; LOHB, W.; PESSÔA FILHO, P.A. Phase equilibrium and insulin partitioning in aqueous two-phase systems containing block copolymers and potassium phosphate. *Fluid Phase Equilibria*, v.215, p.1-15, 2004.

HIRATA, B. D. Produção de ácido clavulânico em batelada alimentada por *Streptomyces clavuligerus* e extração em sistemas de duas fases aquosas. São Carlos DEQ-UFSCar, 2003 (Dissertação de Mestrado).

HUDDLESTON, J. G.; OTTOMAR, K. W.; NGONYANI, D. M.; LYDDIATT, A. Influence of system and molecular parameters fractionation of intracellular proteins from *Saccharomyces* by aqueous two-phase partition. *Enzyme and Microbial Technology*, v.13, p.24-32, 1991.

HWANG, K; HWANG, H. The purification of protein in cross-flow microfiltration of microbe/protein mixtures. *Separation and Purification Technology*, v.51, p.416-423, 2006.

IGARASHI, L.; KIECKBUSCH, T. G.; FRANCO, T. T. Mass transfer in aqueous two-phases system packed column. *Journal of Chromatography B*, v.807, p.75-80, 2004.

KAMIKURA, E. S.; FILHO, F. M. Cromatografia de afinidade. In: Pessoa Jr, A.; Kilikian, B. V. Purificação de produtos biotecnológicos. 1ª edição Barueri-SP, Manole, p.231-247, 2005.

KAUL, A.; PEREIRA, R. A. M., ASENJO, J. A., MERCHUK, J. C. Kinetics separation for polyethylene glycol-phosphate two-phases systems. *Biotechnology and bioengineering*, v. 48, p.246-256, 1995.

KILIKIAN, B. V.; PESSOA JR, A. Purificação de produtos biotecnológicos. In: Schmidell, W.; Lima, U. A.; Aquarone, E.; Borzani, W. *Biotecnologia Industrial. Engenharia Bioquímica*, 1ª ed. São Paulo, Edgard Blücher Ltda, v.2, p.493-514, 2001.

LEE, C.; SANDLER, S. I. Vancomycin partitioning in aqueous two-phase systems: effects of pH, salts, and affinity ligand. *Biotechnology and Bioengineering*, v.35, p.408-416, 1990.

LENTSCH, S.; AIMAR, P.; OROZCO, J. L. Separation albumin-PEG: transmission of Peg through ultrafiltration membranes. *Biotechnology and Bioengineering*, v.41, p.1039-1047, 1993.

LI, S. Z.; LI, X. Y.; CUI, Z. F.; WANG, D. Z. Application of ultrafiltration to improve the extraction of antibiotics. *Separation and Purification Technology*, v.34, p.115-123, 2004.

LI, Y.; SHAHBAZI, A.; KADZERE, C. T. Separation of cells and proteins from fermentation broth using ultrafiltration. *Journal of Food Engineering*, v.75, p.574-580, 2006.

JOHANSSON, G.; TJERNELD, F. Affinity partitioning. In: Street, G. *Highly Selective Separations in Biotechnology*, 1^a ed., Blackie Academic & Professional, p.55-83, 1994.

JIRARATANANON, R.; CHANACHAI, A. A study of fouling in the ultrafiltration of passion fruit juice. *Journal of Membrane Science*, v.111, p. 39-48, 1996.

MARCOS, J. C.; FONSECA, L. P.; RAMALHO, M. T.; CABRAL, J. M. S. Application of surface response analysis to the optimization of penicillin acylase purification in aqueous two-phase systems. *Enzyme and Microbial Technology*, v.31, p. 1006-1014, 2002.

MAUGERI, F. M.; TABOADA, O. M. Cromatografia de interação hidrofóbica. In: Pessoa Jr, A.; Kilikian, B. V. *Purificação de produtos biotecnológicos*. 1^a edição Barueri-SP, Manole, p.212-231, 2005.

MAYERHOFF, Z. D. V. L.; ROBERTO, I. C.; FRANCO, T. T. Purification of xylose reductase from *Candida mogii* in aqueous two-phase systems. *Biochemical Engineering Journal*, v.18, p.217-223, 2004.

MAYER, A. F.; ANSPANCH, F. B.; DECKWER, W.D. Purification clavulanic acid by ion-pairing systems. *Bioseparation*, v.6, p.25-39, 1996.

MAYER, A. F.; HARTMANN, R.; DECKWER, W.D. Diffusivities of clavulanic acid in porous sorption systems with ion-pairing. *Chemical Engineering Science*. v.52, p. 4561-4568, 1997.

McCABE, W. L.; SMITH, J. C.; HARRIOTT, P. Unit operations of chemical engineering. 5ª Edição, Singapura, p.810-837, 1993.

MISTRY, S.L.; KAUL, A.; MERCHUK, J.C.; ASENJO, J.A. Mathematical modeling and computer simulation of aqueous two-phase continuous protein extraction. *Journal of Chromatography A*, v.741, p.151-163, 1996.

MILLIPORE CORPORATION. Protein concentration and diafiltration by tangential flow filtration. Technical Brief, p.1-24, 2003.

MOKHTARANI, B.; KARIMZADEH, R.; AMINI, M. H.; MANESH, S. D. Partitioning of ciprofloxacin in aqueous two-phase system of poly(ethylene glycol) and sodium sulphate. *Biochemical Engineering Journal*, v.38, p.241-247, 2008.

MORÃO, A.; BRITES ALVES, A. M.; CARDOSO, J. P. Ultrafiltration of demethylchlortetracycline industrial fermentation broths. *Separation and Purification Technology*, v.22-23, p. 459-466, 2001.

MORÃO, A. I. C.; BRITES ALVES, A. M.; COSTA, M.C.; CARDOSO, J. P. Nanofiltration of a clarified fermentation broth. *Chemical Engineering Science*, v.61, p.2418-2427, 2006a.

MORÃO, A. I. C.; BRITES ALVES, A. M.; AFONSO, M. D. Concentration of clavulanic acid broths: Influence of the membrane surface charge density on NF operation. *Journal of Membrane Science*, v.281, p.417-428, 2006b.

MORÃO, A. I. C.; BRITES ALVES, A. M.; COSTA, M.C.; CARDOSO, J. P. Optimization of operation mode for the concentration by NF of clarified fermentation broths. *Desalination*, v.200, p.472-474, 2006c.

MURUGESAN, T.; PERUMALSAMY, M. Liquid-liquid equilibria of poly(ethylene glycol) 2000 + sodium citrate + water at (25, 30, 35, 40, and 45) °C. *Journal Chemical Engineering Data*, v.50, p.1392-1395, 2005.

NABAIS, A. M. A.; CARDOSO, J. P. Ultrafiltration of fermented broths solvent extraction of antibiotics. *Bioprocess Engineering*, v.13, p.215-221, 1995.

NABAIS, A. M. A.; CARDOSO, J. P. Purification of benzylpenicillin filtered broths by ultrafiltration and effect on solvent extraction. *Bioprocess Engineering*, v.21, p.157-163, 1999.

ORTIZ, S. C. A.; HOKKA, C. O., BADINO, A. C. Utilization of soybean derivatives on clavulanic acid production by *Streptomyces clavuligerus*. *Enzyme Microbiology Technology*, v.40, p.1071-1077, 2007.

PAYNE, D.J.; CRAMP, R.; WINSTANLEY, D.J.; KNOWLES, D.J.C. Comparative activities of clavulanic acid, sulbactam and tazobactam against clinically important β -lactamases, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v.38, p.767-772, 1994.

PESSOA JR, A. Cromatografia de troca iônica. In: Pessoa Jr, A.; Kilikian, B. V. *Purificação de produtos biotecnológicos*. 1ª edição Barueri-SP, Manole, p.212-231, 2005.

PORTO, T. S. Extração da pró-toxina epsilon e de uma protease a partir de *Clostridium perfringens* em sistemas de duas fases aquosas utilizando PEG/citrato. São Paulo, Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica, USP, p.25-26, 2004. (Dissertação de mestrado)

QUEIROZ, S. C. N.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. Métodos de extração e/ou concentração de compostos encontrados em fluidos biológicos para posterior determinação cromatográfica. Química Nova, v.24, p.68-76, 2001.

RAGESH, P.; SREENIVAS, K.; DASGUPTA, S.; DE, S. Integral analysis of hydrodynamic and mass transfer in radial cross flow ultrafiltration system under laminar flow. International Journal of Transport Phenomena, v.5, p.129-144, 2003.

RAGHAVARAO, K.S.M.S.; RANGANATHAN, T.V.; SRINIVAS, N.D.; BARHATE, R. S. Aqueous two phase extraction-an environmentally benign technique. Clean Techn Environ Policy, v.5, p.136-141, 2003.

RAHBARI-SISAKHT, M.; TAGHIZADEH, M; ELIASSI, A. Densities and Viscosities of Binary Mixtures of Poly(ethylene glycol) and Poly(propylene glycol) in Water and Ethanol in the 293.15-338.15 K Temperature Range. Journal of Chemical and Engineering Data, v. 48, p.1221-1224, 2003.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. Planejamento de experimentos e otimização de processos. 1ª edição, Campinas-sp, Editora: Casa do Pão Editora, 2005.

ROLINSON, G. N.; GEDDES, A. M. The 50th anniversary of the discovery of 6-aminopenicillanic acid (6-APA). International Journal of Antimicrobial Agents, v.29, p.3-8, 2007.

ROTHSCHILD, Z. Cromatografia por exclusão. In: Collins, C. H.; Braga, G. L.; Bonato, P. S. Fundamentos de cromatografia. 1ª reimpressão Campinas. Editora UNICAMP, p.139-166, 2007

SALAMANCA, M. H.; MERCHUK, J. C.; ANDREWS, B. A.; ASENJO, J. A. On the kinetics of phase separation in aqueous two-phase systems. *Journal of Chromatography B*, v.711, p.319-329, 1998.

SANTOS, V. C.; PEREIRA, J. F. B.; HAGA, R. B.; RANGEL-YAGUI, C. O.; TEIXEIRA, J. A. C.; CONVERTI, A.; PESSOA JR, A. Stability of clavulanic acid under variable pH, ionic strength and temperature conditions. A new kinetic approach. *Biochemical Engineering Journal*, v.45, p.89-93, 2009.

SARMENTO, M. J.; PIRES, M. J.; CABRAL, J. M. S.; AIRES-BARROS, M. R. Liquid-liquid extraction of a recombinant protein, cytochrome b5, with aqueous two-phase systems of polyethylene glycol and potassium phosphate salts. *Journal of Chromatography A*, v.668, p.117-120, 1994.

SAUDAGAR, P. S.; SURVASE, S. A.; SINGHAL, R. S. Clavulanic acid: A review. *Biotechnology Advances*, v.26, p.335-351, 2008.

SCOPE, R. K. Protein purification. Principles and Practice. Second Edition, Springer verlag, 1982.

SEADER, J. P.; HENLEY, J. E. Separation process principles. John Wiley & Sons, New York, p.886, 1998.

SEBASTIÃO, M. J.; CABRAL, J. M. S.; AIRES-BARROS, M. R. Partitioning of recombinant *Fusarium solani pisi* curtinase in polyethylene glycol aqueous salt solution two-phase systems. *Chromatography A*, v.668, p.139-144, 1994.

SHANG, Q.K.; LI, W.; JIA, Q.; LI D.Q. Partitioning behavior of amino acids in aqueous two-phase systems containing polyethylene glycol and phosphate buffer. *Fluid Phase Equilibria*, v.219, p.195–203, 2004.

SILVA, M. E.; KULA, M. R.; FRANCO, T. T. Uso de polietilenoglicol modificado para purificação de lizosima em sistema de duas fases aquosas. *Revista de Ciência & Tecnologia*, v.14, p.105-112, 1999.

SILVA, M. E.; FRANCO, T. T. Liquid-liquid extraction of biomolecules in downstream processing. *Brazilian Journal of and Bioengineering*, v.17, p.1-17, 2000.

SILVA, C. S., CASTRO JR, S. A.; JACINTO, J. S.; HOKKA, C. O.; PASOTTO, M. B. Aspectos Gerais da Microfiltração e Ultrafiltração na Separação de Acido Clavulânico de Caldos de Fermentação. In: *Simpósio Nacional de Fermentação - Sinaferm, 2007*, Curitiba.

SILVA, C. S.; BOVAROTTI, E.; RODRIGUES, M. I.; HOKKA, C. O.; BARBOZA, M. Avaliação de efeitos de parâmetros envolvidos na purificação do ácido clavulânico através dos sistemas de duas fases aquosas. In: *XVII congresso brasileiro de engenharia química, 2008, Recife. XVII COBEQ, 2008*.

SIMON, L.; GAUTAM, S. Modeling continuous aqueous two-phase systems for control purposes. *Journal of Chromatography A*, v.1043, p.135-147, 2004.

SIRINIVAS, N.D.; BARHATE, R.S.; RAGHAVARAO, K.S.M.S. Aqueous two-phase extraction in combination with ultrafiltration for downstream processing of Ipomoea peroxidase. *Journal of Food Engineering*, v.54, p.1-6, 2002.

SLEIJKO, F. L. Adsorption technology: a step-by-step approach to process evaluation and application. Marcel Dekker, Inc., New York, 1985.

SKOOG, B. Determination of polyethylene glycols 4000 and 6000 in plasma protein preparations. *Vox Sang*, v.37, p.345-349, 1979.

SOLANO-CASTILLO, C.; RITO-PALOMARES, M. Kinetics of phase separation under different process and design parameters in aqueous two-phase systems. *Journal of Chromatography B*, v.743, p.195-201, 2000.

SPADARO; A. C. C. Cromatografia por troca iônica. In: Collins, C. H.; Braga, G. L.; Bonato, P. S. Fundamentos de cromatografia. 1ª reimpressão Campinas. Editora UNICAMP, p.103-137, 2007a.

SPADARO; A. C. C.; FONSECA, M. J. V. Cromatografia por bioafinidade. In: Collins, C. H.; Braga, G. L.; Bonato, P. S. Fundamentos de cromatografia. 1ª reimpressão Campinas. Editora UNICAMP, p.167-200, 2007b.

TANUJA, S.; SRINIVAS, N. D.; RAGHAVA RAO, K. S. M. S.; GOWTHAMAN, M. K. Aqueous two-phase extraction for downstream processing of amyloglucosidase. *Process Biochemistry*, v.32, p.635-641, 1997.

TEODORO, J. C.; BAPTISTA-NETO, A.; CRUZ-HERNANDEZ, I. L., HOKKA, C. O., BADINO, A. C. Influence of feeding conditions on clavulanic acid production in fed-batch cultivation with medium containing glycerol. *Applied Microbiology Biotechnology*, v.72, p.450-455. 2005.

TESSIER, L.; BOUCHARD, P.; RAHNI, M. Separation and purification of benzylpenicillin produced by fermentation using coupled ultrafiltration and nanofiltration technologies. *Journal of Biotechnology*, v.116, p.79-89, 2005.

VELA, M. C. V.; BLANCO, S. A.; GARCÍA, J. L. RODRÍGUEZ, E. B. Prediction of flux decline in the ultrafiltration of Macromolecules. *Desalination*, v.192, p. 323-329, 2006.

VERMEULEN, T.; ANDERSON, R. A. Adsorption. In: McKetta, J. J. *Unit operations handbook*, 1ª ed. New York, MerceL Dekker, Inc, v.1, p.133-183, 1993.

VIDEIRA, M.; AIRES-BARROS, M. R. Liquid-liquid extraction of clavulanic acid using an aqueous two-phase system of polyethylene glycol and potassium phosphate. *Journal of Chromatography A*, v. 668, p.237-240, 1994.

VOGEL, A. I. *Textbook of practical organic chemistry*. 5ed New York, Logman Scientific & Technical, 1989.

WALTER, H.; WIDEN, K. Cell partition in two-polymer aqueous two-phase systems and cell electrophoresis in aqueous polymer solutions red blood cells from different species. *Journal of Chromatography A*, v.668, p.185-190, 1994.

WU, Y.; PEREIRA, M.; VENÂNCIO, A.; TEIXEIRA, J. Recovery of endopolygalacturose using polyethylene glycol-salt aqueous two-phase with polymer recycling. *Bioseparation*, v.9, p.247-254, 2000.

WU, Y.; PEREIRA, M.; VENÂNCIO, A.; TEIXEIRA, J. Separation of endopolygalacturonase using aqueous two-phase Partitioning. *Journal of Chromatography A*, v.929, p.23-29, 2001.

ZAIDI, S. K.; KUMAR, A. Effects of ethanol concentration on flux and gel formation in dead end ultrafiltration of PEG and dextran. *Journal of Membrane Science*, v.237, p.189-197, 2004.

ZHOU, H.; NI, J.; HUANGA, W.; ZHANG, J. Separation of hyaluronic acid from fermentation broth by tangential flow microfiltration and ultrafiltration. *Separation and Purification Technology*, v.25, p.29-38, 2006.

ZUÑIGA, A. D. G.; PEREIRA, J. A. M.; COIMBRA, J. S. R.; MINIM, L. A.; ROJAS, E. E. G. Técnicas usadas no processo de purificação de biomoléculas, *Boletim CEPPA*, v.21, p.61-82, 2003.

ZIJLSTRA, G. M.; GOOIJERT, C. D.; TRAMPERT, J. Extractive bioconversions in aqueous two-phase systems. *Current Opinion in Biotechnology*, v.9, p.171-176, 1998.

Mídia eletrônica:

<<http://www.gelifesciences.com/>> (chromatography–ion exchange), Data de acesso: 10, março, 2010.

<<http://www.sigmaaldrich.com/>> (chromatography–ion exchange), Data de acesso: 10, março, 2010.

<<http://www3.bio-rad.com/>> (chromatography–ion exchange), Data de acesso: 10, março, 2010.

HANFT, S. Ultrafiltration Membrane Markets. Disponível em: <www.bccresearch.com/report/MST044B.html> Data de acesso: 10, novembro, 2007.

GE HEALTHCARE <<http://www.gelifesciences.com/>> (Support > Specifications > Hollow fiber cartridges and housings > Xampler cartridges > 3M, 3MA, 3x2M & 3x2MA)> Data de acesso: 10, janeiro, 2010