

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

SEPARAÇÃO DE AMPICILINA PRODUZIDA ENZIMATICAMENTE
POR REAÇÃO ENTRE ESTER METÁLICO DE FENILGLICINA E
ÁCIDO 6-AMINOPENICILÂNICO

Marcelo Fernandes Vieira

São Carlos-SP
Novembro 2003

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

SEPARAÇÃO DE AMPICILINA PRODUZIDA ENZIMATICAMENTE
POR REAÇÃO ENTRE ESTER METÁLICO DE FENILGLICINA E
ÁCIDO 6-AMINOPENICILÂNICO.

Marcelo Fernandes Vieira

Tese de Doutorado 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.

Orientador:

Prof^a Dr^a Raquel de Lima Camargo Giordano

São Carlos-SP
Novembro 2003

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

V657sa

Vieira, Marcelo Fernandes.

Separação de ampicilina produzida enzimaticamente por reação entre éster metílico de fenilglicina e ácido 6-aminopenicilânico / Marcelo Fernandes Vieira . -- São Carlos : UFSCar, 2003.
167 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2003.

1. Engenharia bioquímica. 2. Adsorção. 3. Ampicilina. 4. Cristalização. 5. Síntese enzimática. 6. Purificação de antibióticos. I. Título.

CDD: 660.63 (20^a)

Agradecimentos

Apesar da dificuldade de se expressar em palavras a gratidão que sinto por todos que colaboraram com este projeto, gostaria de tentar registrar meus sinceros agradecimentos:

À orientadora prof^a Dr^a Raquel de Lima Camargo Giordano, pela amizade, orientação, empenho e dedicação incansáveis para o desenvolvimento deste trabalho, assim como para o meu crescimento como pessoa e pesquisador. Muito obrigado Raquel!

Ao prof. Dr. Roberto de Lima Campos Giordano, pela ajuda técnica e pela incansável vontade de colaborar com este trabalho. Obrigado por tudo Roberto.

Ao prof. Dr. Marlei Barboza pela ajuda prestada ao longo do desenvolvimento desse trabalho, trazendo a sua experiência em trabalho com adsorção.

A amiga e doutoranda Andréa pela ajuda no início de tudo, pelo espírito profissional e de grupo colaborando sempre com seus conhecimentos.

Aos pesquisadores do Instituto de Catálise e Petroquímica de Madri, representados aqui pelos pesquisadores José Manuel Guisán, sua esposa Mari Carmem, Roberto Lafuentes e Benevides Costa, por toda atenção e carinho dedicados durante a nossa estadia no seu laboratório.

A doutoranda Angélica Vieira, minha esposa, pela colaboração nas discussões e principalmente pela compreensão e paciência dedicadas a min.

Ao amigo Dr. Paulo Waldir Tardioli (meu irmão Paulinho) pela ajuda nas discussões técnicas e não técnicas que ao longo desse doutorado foram importantes tanto para meu crescimento pessoal como profissional. Obrigado Paulinho.

Aos amigos Amauri, Célia, Charles, Edson, Manuel Marcelo, Rose e Antonio pela amizade e descontração que fizeram desses quatro anos, inesquecíveis.

Aos Colegas de laboratório Álvaro, Amadeus, Juliana Kamilla, Laura, Marcelo Ribeiro e Vanessa pelos momentos de descontração ao longo desses anos.

As agências de fomento a pesquisa, CNPq pela bolsa concedida para realização desse doutorado e a CAPES pela bolsa concedido para o estágio realizado em Madri.

SUMÁRIO

Índice	i
Lista de Figuras	vi
Lista de Tabelas	xi
Nomenclatura.....	xiv
Resumo	xvi
Abstract.....	xviii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1 - Antibióticos β -lactâmicos.....	4
2.1.1 - Penicilinas.....	5
2.1.2 - Penicilinas Naturais	6
2.1.3 - Penicilinas Semi-Sintéticas (SSPs).....	7
2.1.4 - Ampicilina	7
2.1.5 - Estratégias de Síntese Enzimática de Antibióticos β -Lactâmicos.....	9
2.2 - Produção de Antibióticos Semi-Sintéticos	10
2.2.1 - Síntese Enzimática de Ampicilina.....	11
2.2.2 - Síntese Termodinamicamente Controlada.....	12

2.2.3 - Síntese Cineticamente Controlada.....	13
2.3 - Processos de Separação Aplicados à Biotecnologia.....	15
2.3.1 - Características das Bioseparações	17
2.3.2 - Precipitação no Ponto Isoelétrico	19
2.3.2.1 - Cálculo do ponto isoelétrico	22
2.3.3 - Recristalização.....	23
2.3.4 - Processos de Adsorção	24
2.3.4.1 - Sistemas em Batelada.....	26
2.3.4.2 - Sistemas em Coluna.....	27
2.3.4.3 - Leitos Empacotados versus Tanques Agitados.....	30
2.3.4.4- Tempo em Função Volume de Leito.....	31
2.3.4.5 - Eficiência do Leito	32
2.3.4.6 - Adsorventes Comuns	33
2.3.4.7 - Isotermas de Adsorção	35
2.3.4.7.1 -Isoterma Linear	36
2.3.4.7.2 -Isoterma de Freundlich.....	36
2.3.4.7.3 -Isoterma de Langmuir	37
2.3.4.8 - Taxas de Adsorção.....	38
2.4 - Configurações para Produção Enzimática de Antibióticos β -Lactâmicos	39

3. MATERIAIS E MÉTODOS	45
3.1 - Materiais	45
3.2 - Equipamentos	45
3.3 - Métodos	46
3.3.1 -Determinação das Solubilidades dos Compostos	46
3.3.2 -Determinação das Constantes de Dissociação	46
3.3.3 -Ensaio de Adsorção em Batelada	46
3.3.3.1 – Determinação do Tempo de Equilíbrio	46
3.3.3.2 – Determinação da Eficiência de Adsorção	47
3.3.3.3 – Isotermas de Equilíbrio	50
3.3.4 -Ensaio em Coluna	54
3.3.5 -Análise de Momento	51
3.3.5.1 - Sistema de Operação em Leito Fixo 1 – Coluna K9/15.....	58
3.3.5.2 - Determinação da Porosidade do Leito e Coeficientes de Partição.....	58
3.3.5.3 - Determinação dos Parâmetros de Transferência de Massa.....	59
3.3.5.4 - Determinação das Curvas de Saturação e Eluição	59
3.3.5.5 - Parâmetros para Avaliação do Desempenho da Coluna	60
3.3.6 -Sistema de Operação em Leito Fixo 2 – Coluna 50	61
3.3.7 -Ensaio de Precipitação no Ponto Isoelétrico	62
3.3.8 -Curvas de Calibração	63
3.3.9 -Análises das Concentrações dos Substratos e Produtos de Síntese	65

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	66
4.1 - Ensaio Preliminares	66
4.2 - Determinação das Eficiências de Adsorção	69
4.2.1 - Determinação do Tempo de Contato	70
4.2.2 - Efeito do pH na Eficiência de Adsorção.....	73
4.2.2.1 - Efeito do pH na Eficiência de Adsorção Utilizando Resina XAD-4	73
4.2.2.2 - Efeito do pH na Eficiência de Adsorção Utilizando Resina XAD-7	75
4.2.2.3 - Efeito do pH na Eficiência de Adsorção Utilizando Resina XAD-761	77
4.3 - Isotermas de adsorção.....	79
4.3.1 - Isotermas de Equilíbrio Utilizando Resina Amberlite XAD-4.....	80
4.3.2 - Isotermas de Equilíbrio Utilizando Resina Amberlite XAD-7	88
4.3.3 - Isotermas de Equilíbrio Utilizando Resina Amberlite XAD-761	94
4.4 - Ensaio em Coluna	102
4.4.1 - Determinação da Porosidade do Leito e Coeficientes de Partição Coluna K9/15	103
4.4.2 - Determinação dos Coeficientes de Transferência de Massa.....	104
4.4.3 - Influência do Diâmetro da Partícula na Resolução das Curvas de Eluição.....	105
4.4.4 - Influência da Temperatura nas Curvas de Eluição Cromatográfica de Fenilglicina.....	108
4.4.5 - Ensaio para Determinação das Curvas de Ruptura	111
4.4.6 - Ensaio de Separação de Ampicilina e Fenilglicina	114

4.4.7 - Efeito do Etanol na Separação e Concentração dos Compostos (coluna K9/15).....	117
4.4.8 - Efeito do Etanol na Separação e Concentração dos Compostos (coluna C50)..	120
4.4.9 - Resultados dos Ensaios de Precipitação no Ponto Isoelétrico	127
5. CONCLUSÕES.....	133
6. SUGESTÕES.....	136
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	137

Lista de Figuras

Figura 2.1- Ácido 6-aminopenicilânico (6-APA): estrutura principal da penicilina G e comum a todas as penicilinas (Pelczar e colaboradores, 1996).....	4
Figura 2.2- Antibióticos β -lactâmicos comercialmente importantes (Ghosh e colaboradores, 1996).....	5
Figura 2.3 - Estrutura molecular da Penicilina G	6
Figura 2.4- Estrutura da ampicilina	8
Figura 2.5- Síntese de ampicilina cineticamente controlada.	14
Figura 2.6- Curva de titulação de uma solução de glicina 0,1M a 25°C. Os retângulos centrados ao redor de pKs indicam as regiões de grande capacidade de tamponamento, (Lehninger e colaboradores, 1995).	20
Figura 2.7- (a) Interações entre os grupos α -amino e α -carboxílicos em um α -aminoácido. A carga positiva do grupo $-\text{NH}_3^+$, próximo do grupo carboxílico, torna a ionização mais fácil (isto é, diminui o pKa do $-\text{COOH}$). Isto é devido à interação estabilizadora entre as cargas oposta no “zwitterion” e a uma interação repulsiva entre a carga positiva do grupo amino e aquela do próton que sai. (b) O pKa normal para o grupo carboxílico é aproximadamente 4,76, semelhante à do ácido acético (Lehninger e colaboradores, 1995).	21
Figura 2.8- Recristalização simples. Este esquema, que utiliza solvente puro para cada recristalização, fornece alta pureza, porém baixo rendimento (Belter e colaboradores, 1988).	24
Figura 2.9- (a) Reator em batelada . (b) Reator de mistura. (Slejko, 1985).	26
Figura 2.10- Representação esquemática das etapas que compõe um processo de adsorção (Verral, 1996).	28

Figura 2.11- Representação esquemática de uma curva de ruptura para um leito fixo adsorvente (Slejko,1985)	29
Figura 2.12- Concentrações num leito empacotado contra aquelas encontradas num tanque agitado (Cussler, 1997)	31
Figura 2.13- Curva de ruptura típica para adsorção em leito empacotado: Concentração de soluto (y) na corrente de saída em função do tempo (Cussler, 1997).....	32
Figura 2.14- Isotermas comuns de adsorção. Todas isotermas podem se aproximar de uma Linear para soluções altamente diluídas (Cussel, 1997).....	35
Figura 2.15- Etapas de transporte de massa na adsorção utilizando adsorventes porosos (Slejko, 1985).....	38
Figura 2.16- Sistema utilizando catalisador com densidade menor que a do líquido utilizado por Kaasgaard e colaboradores, 1992.	40
Figura 2.17- Fluxograma geral de recuperação de antibióticos β -lactâmicos.....	41
Figura 2.18- Fluxograma para obtenção de ampicilina	42
Figura 2.19- Fluxograma para obtenção de amoxicilina	42
Figura 2.20- Representação esquemática da produção de Amoxicilina proposta por Clausen e Dekkers, 2000.	43
Figura 3.1 - Representação esquemática da seqüência utilizada nos ensaios em batelada	48
Figura 3.2 - Representação esquemática do sistema utilizado para os ensaios em coluna.....	51
Figura 3.3 - Representação esquemática de duas zonas cromatográficas (Snyder e colaboradores, 1997).....	61
Figura 3.4 - Representação esquemática da seqüência utilizada nos ensaios de precipitação no ponto isoelétrico da ampicilina.	63
Figura 3.5 - Curva de calibração para o EMFG a 240nm pH=6,5	64
Figura 3.6 - Curva de calibração para o 6-APA a 240nm pH=6,5	64
Figura 3.7 - Curva de calibração para FG a 240nm pH=6,5	64
Figura 3.8 - Curva de calibração para AMPI a 240nm pH=6,5	64

Figura 3.9 - Cromatograma dos compostos analisados em HPLC	65
Figura 4.1 - Solubilidade ampicilina e fenilglicina em água à 25°C, função do pH	67
Figura 4.2 - Solubilidade EMFG e 6-APA em água à 25°C como função do pH	68
Figura 4.3 - Teste de equilíbrio utilizando resina Amberlite XAD-4 (T=25°C, pH=6,5, V _s =5mL, Co=5mM, m _r =0,25g).....	71
Figura 4.4 - Teste de equilíbrio utilizando resina Amberlite XAD-4 (T=4°C, pH=6,5, V _s =5mL, Co=5mM, m _r =0,25g).....	71
Figura 4.5 - Efeito do pH sobre a eficiência de adsorção - Resina XAD-4.....	74
Figura 4.6 - Efeito do pH sobre a eficiência de adsorção - Resina XAD-7.....	75
Figura 4.7 - Efeito do pH sobre a eficiência de adsorção - Resina XAD-761.....	77
Figura 4.8 - Isoterma de adsorção de 6-APA utilizando resina XAD-4, pH 6,5	81
Figura 4.9 - Isoterma de adsorção de EMFG utilizando resina XAD-4, pH 6,5	82
Figura 4.10 - Isoterma de adsorção de EMFG utilizando resina XAD-4, pH 4,5	84
Figura 4.11 - Isotermas de adsorção de FG utilizando resina XAD-4, pH 6,5.....	85
Figura 4.12 - Isotermas de adsorção de FG utilizando resina XAD-4, pH 4,5.....	87
Figura 4.13 - Isoterma de adsorção de ampicilina utilizando resina XAD-4	88
Figura 4.14 - Isoterma de adsorção de 6-APA utilizando resina XAD-7, pH 6,5	90
Figura 4.15 - Isoterma de adsorção de ampi utilizando resina XAD-7, pH 6,5	91
Figura 4.16 - Isoterma de adsorção de EMFG utilizando resina XAD-7, pH 6,5	93
Figura 4.17 - Isoterma de adsorção de FG utilizando resina XAD-7, pH 6,5	94
Figura 4.18 - Isoterma de adsorção de 6-APA utilizando resina XAD-761, pH 6,5.....	96
Figura 4.19 - Isoterma de adsorção de ampi utilizando resina XAD-761, pH 6,5.	97
Figura 4.20 - Isoterma de adsorção de EMFG utilizando resina XAD-761, pH 6,5	99
Figura 4.21 - Isoterma de adsorção de EMFG em resina XAD-761; pH 4,5	100
Figura 4.22 - Isoterma de adsorção de FG utilizando resina XAD-761, pH 6,5	101
Figura 4.23 - L/tR x velocidade superficial.....	103

Figura 4.24 - Altura do prato teórico corrigido x velocidade intersticial	104
Figura 4.25 - Curvas de eluição de fenilglicina utilizando $dp=0,033\text{cm}$	107
Figura 4.26 - Curvas de eluição de fenilglicina utilizando $dp=0,06\text{cm}$	107
Figura 4.27 - Comparação das curvas de eluição de fenilglicina para diferentes dp	108
Figura 4.28 - Curvas de eluição de FG utilizando temperatura de 10°C	109
Figura 4.29 - Curvas de eluição de FG utilizando temperatura de 40°C	109
Figura 4.30 - Comparação das curvas de eluição de FG em diferentes temperaturas.....	110
Figura 4.31 - Comparação das curvas de eluição de ampicilina	111
Figura 4.32 - Curvas de ruptura para fenilglicina em diferentes vazões	112
Figura 4.33 - Curvas de ruptura e desorção obtidas para fenilglicina em diferentes temperaturas.....	113
Figura 4.34 - Curvas de ruptura para ampicilina e fenilglicina como função do tempo	114
Figura 4.35 - Curvas de ruptura para ampicilina e fenilglicina como função do no de volumes de leito.....	114
Figura 4.36 - Separação de ampicilina e fenilglicina usando vazão de $2,0\text{ mL/min}$	116
Figura 4.37 - Separação de ampicilina e fenilglicina usando vazão de $1,0\text{ mL/min}$	116
Figura 4.38 - Separação de ampicilina e fenilglicina usando vazão de $0,5\text{ mL/min}$	116
Figura 4.39 - Efeito da presença de etanol nas curvas de eluição de ampicilina (função do tempo).....	117
Figura 4.40 - Efeito da presença de etanol nas curvas de eluição de ampicilina (função do vol. de eluição).....	117
Figura 4.41 - Efeito da presença de etanol nas curvas de eluição de fenilglicina como função do volume de eluição.	118
Figura 4.42 - Comparação entre as curvas de eluição de ampicilina e fenilglicina para 15% de etanol na fase móvel	120
Figura 4.43 - Efeito do etanol nas curvas de eluição de FG como função do vol. de eluição (coluna C50).	121

Figura 4.44 - Efeito do etanol nas curvas de eluição de FG como função tempo de eluição (coluna C50).	121
Figura 4.45 - Curvas de eluição de ampicilina em diferentes concentrações de etanol (coluna C50)	122
Figura 4.46 - Efeito da presença de etanol nas curvas de eluição de ampicilina como função do volume de eluição (coluna C50).	123
Figura 4.47 - Efeito da presença de etanol nas curvas de eluição de ampicilina como função do tempo de eluição (coluna C50).	124
Figura 4.48 - Separação de ampicilina e fenilglicina usando vazão de 0,25 mL/min (coluna C50)	125
Figura 4.49 - Separação de ampicilina e fenilglicina usando vazão de 1,0 mL/min (coluna C50 c/ 15% etanol)	126
Figura 4.50 - Separação de ampicilina e fenilglicina usando vazão de 0,25 mL/min (coluna C50 c/ 15% etanol)	126

Lista de Tabelas

Tabela 2.1 - Ampicilina: Importações pelo Brasil de princípios ativos e medicamentos formulados em 2001-2002.....	9
Tabela 2.2 - Dimensões Aparentes de Pequenas Partículas, Moléculas e Íons.....	16
Tabela 2.3 - Tipos de moléculas produzidas em biotecnologia (Belter e colab., 1988).....	18
Tabela 2.4 - Propriedades Físico-químicas para o desenvolvimento de processos de separação (Garside, 1994).....	19
Tabela 4.1 - Constantes de dissociação e pontos isoelétricos dos compostos como função do conteúdo de metanol.....	69
Tabela 4.2 - Comparação das eficiências de adsorção a 4°C e 25°C utilizando as resinas XAD-4, XAD-7 e XAD 761 (pH=6,5, Vs=5mL, Co=5mM, mr=0,25g).....	72
Tabela 4.3 - Seletividades das resinas XAD-4, XAD-7 e XAD-761 para ampicilina em relação ao EMFG, 6-APA e fenilglicina em vários pHs.....	79
Tabela 4.4 - Resultados experimentais obtidos na determinação da isoterma de equilíbrio para 6-APA utilizando resina XAD-4; pH 6,5.	80
Tabela 4.5 - Parâmetros de ajuste dos modelos de Langmuir, Freundlich e Linear para o 6-APA e seus coeficientes de correlação. Resina XAD-4, pH 6,5.	81
Tabela 4.6 - Resultados experimentais obtidos na determinação da isoterma de equilíbrio para EMFG utilizando resina XAD-4; pH 6,5.	81
Tabela 4.7 - Parâmetros de ajuste dos modelos de Langmuir, Freundlich e Linear para o EMFG e seus coeficientes de correlação. Resina XAD-4, pH 6,5.	82
Tabela 4.8 - Resultados experimentais obtidos na determinação da isoterma de equilíbrio para EMFG a pH=4,5 utilizando resina XAD-4	83
Tabela 4.9 - Parâmetros de ajuste aos modelos de Langmuir, Freundlich e Linear para EMFG, e seus coeficientes de correlação. Resina XAD-4, pH 4,5.	84
Tabela 4.10 - Resultados experimentais obtidos na determinação da isoterma de equilíbrio para fenilglicina em resina XAD-4 a pH 6,5	84

Tabela 4.11 - Parâmetros de ajuste aos modelos de Langmuir, Freundlich e Linear para fenilglicina e seus coeficientes de correlação. Resina XAD-4, pH 6,5.....	85
Tabela 4.12 - Resultados experimentais obtidos na determinação da isoterma de equilíbrio para fenilglicina em resina XAD-4 a pH=4,5.....	86
Tabela 4.13 - Parâmetros de ajuste aos modelos de Langmuir, Freundlich e Linear para fenilglicina, e seus coeficientes de correlação. Resina XAD-4 pH 4,5.....	87
Tabela 4.14 - Resultados experimentais obtidos na determinação da isoterma de equilíbrio para ampicilina	87
Tabela 4.15 - Parâmetros de ajuste aos modelos de Langmuir, Freundlich e Linear para o ampicilina e seus coeficientes de correlação. Resina XAD-4, pH 6,5..	88
Tabela 4.16 - Resultados experimentais obtidos na determinação da isoterma de equilíbrio para 6-APA em resina XAD-7	89
Tabela 4.17 - Parâmetros de ajuste aos modelos de Langmuir, Freundlich e Linear para 6-APA e seus coeficientes de correlação. Resina XAD-7, pH 6,5.....	90
Tabela 4.18 - Resultados experimentais obtidos na determinação da isoterma de equilíbrio para ampicilina em resina XAD-7 e pH 6,5.	90
Tabela 4.19 - Parâmetros de ajuste aos modelos de Langmuir, Freundlich e Linear para o ampicilina , e seus coeficientes de correlação. Resina XAD-7, pH 6,5	91
Tabela 4.20 - Resultados experimentais obtidos na determinação da isoterma de equilíbrio para EMFG em resina XAD-7 e pH 6,5.....	92
Tabela 4.21 - Parâmetros de ajuste aos modelos de Langmuir, Freundlich e Linear para o EMFG, e seus coeficientes de correlação. Resina XAD-7, pH 6,5.....	93
Tabela 4.22 - Resultados experimentais obtidos na determinação da isoterma de equilíbrio para fenilglicina utilizando resina XAD-7 e pH 6,5.....	93
Tabela 4.23 - Parâmetros de ajuste aos modelos de Langmuir, Freundlich e Linear para FG e seus coeficientes de correlação. Resina XAD-7, pH 6,5.....	94
Tabela 4.24 - Resultados experimentais obtidos na determinação da isoterma de equilíbrio para 6-APA em resina XAD-761 e pH 6,5.....	95

Tabela 4.25 - Parâmetros de ajuste aos modelos de Langmuir, Freundlich e Linear para 6-APA e seus coeficientes de correlação. Resina XAD-761, pH 6,5.....	96
Tabela 4.26 - Resultados experimentais obtidos na determinação da isoterma de equilíbrio para ampicilina em resina XAD-7 e pH 6,5.	96
Tabela 4.27 - Parâmetros de ajuste aos modelos de Langmuir, Freundlich e Linear para o ampicilina , e seus coeficientes de correlação. Resina XADA-761, pH 6,5.	97
Tabela 4.28 - Resultados experimentais obtidos na determinação da isoterma de equilíbrio para EMFG em resina XAD-761 e pH 6,5.	98
Tabela 4.29 - Parâmetros de ajuste aos modelos de Langmuir, Freundlich e Linear para o EMFG, e seus coeficientes de correlação. Resina XAD-761, pH 6,5.....	99
Tabela 4.30 - Resultados experimentais obtidos na determinação da isoterma de equilíbrio para EMFG a pH=4,5 utilizando resina XAD-761.....	99
Tabela 4.31 - Parâmetros de ajuste aos modelos de Langmuir, Freundlich e Linear para o EMFG, e seus coeficientes de correlação. Resina XAD-761, pH 4,5.....	100
Tabela 4.32 - Resultados experimentais obtidos na determinação da isoterma de equilíbrio para fenilglicina utilizando resina XAD-761 e pH 6,5.....	101
Tabela 4.33 - Parâmetros de ajuste aos modelos de Langmuir, Freundlich e Linear para fenilglicina, e seus coeficientes de correlação. Resina XAD-761, pH 6,5.....	101
Tabela 4.34 - Comparação dos valores de D_p e E_b experimentais e calculados.....	105
Tabela 4.35 - Graus de pureza dos cristais de ampicilina ou feniglicina obtidos utilizando HCl e temperatura de 25°C na precipitação de ampicilina	127
Tabela 4.36 - Graus de pureza dos cristais de ampicilina ou feniglicina obtidos utilizando HCl e temperatura de 4°C na precipitação de ampicilina	128
Tabela 4.37 - Graus de pureza dos cristais de ampicilina ou feniglicina obtidos utilizando H_2SO_4 e temperatura de 25°C na precipitação de ampicilina.....	129
Tabela 4.38 - Graus de pureza dos cristais de ampicilina ou feniglicina obtidos utilizando H_2SO_4 e temperatura de 4°C na precipitação de ampicilina.....	130

Nomenclatura

6-APA	Ácido 6-amino penicilânico	
ampi	Ampicilina	
c	Concentração de soluto na fase móvel dentro da partícula	mg/mL
C	Concentração do soluto na eluição	mg/mL
C*	Concentração de soluto em solução no equilíbrio	mg/mL
C _{máx}	Concentração máxima de soluto na eluição	mg/mL
Co	Concentração inicial	mM
D	Diâmetro do leito fixo	cm
D _p	Coefficiente de difusão efetiva no poro	cm ² /s
dp	Diâmetro médio das partículas da resina	cm
E _b	Coefficiente de dispersão axial	cm ² /s
EMFG	Éster metílico de fenilglicina	
FG	Fenilglicina	
H	Altura do leito	cm
HETP	Altura do prato teórico	cm
HETP _{corrigido}	Altura do prato teórico corrigido	cm
HPG	p-hidroxifenilglicina	
HPGM	Éster de p-hidroxifenilglicina	
K _F	Constante de equilíbrio de Freundlich	mg/mL
K _f	Coefficiente de transferência de massa no filme	cm/s
K _L	Constante de equilíbrio de Langmuir	mg/mL

K_p	Constante de equilíbrio de Henry ou coeficiente de partição	mg/mL
m_r	Massa de resinas	g
n	Índice da isoterma de Freundlich	
$PeMp$	Número de Peclet da partícula	
PGA	Penicilina G acilase	
pI	Ponto isoelétrico ou pH isoelétrico	
pK	Constante de equilíbrio de ionização	
Q	Concentração do soluto na fase sólida	mg/mL
Q	Vazão de injeção	mL/min
q^*	Quantidade de soluto adsorvida pela resina no equilíbrio	mg/g resina
q_m	Quantidade máxima de adsorção da resina	mg/g resina
Rep	Número de Reynolds da partícula	
t_m	Tempo morto	min
t_o	Tempo de injeção do pulso de amostra	min
t_R	Tempo de retenção do soluto	min
v	Velocidade intersticial	cm/min
V_m	Volume morto	mL
v_o	Velocidade superficial	cm/min
V_s	Volume de solução	mL
ε	Porosidade do leito	
μ	Primeiro momento da curva de eluição	min
σ	Segundo momento da curva de eluição	min ²
ν	Viscosidade cinemática da solução	cm ² /min
ε_p	Porosidade da partícula	

RESUMO

Estudou-se neste trabalho o processo de separação/concentração dos produtos da síntese de ampicilina, catalisada pela enzima penicilina G acilase imobilizada, através das técnicas de adsorção em resina hidrofóbica e precipitação no ponto isoelétrico. O antibiótico era produzido pela reação entre ácido 6-amino penicilânico (6-APA) e éster metílico de fenilglicina (EMFG), gerando também fenilglicina (FG) como sub-produto.

Visando conhecimento das propriedades físico-químicas dos componentes da reação, a pesquisa se iniciou pela determinação dos pontos isoelétricos dos compostos que envolvem a reação de síntese, assim como determinação da influência do pH (na faixa de 5,5 a 7,5) na solubilidade dos mesmos. Os resultados obtidos, que estão em acordo com os disponíveis na literatura, mostraram que o aumento do pH conduz a um aumento na solubilidade da ampicilina e de 6-APA. No sentido oposto, o éster metílico de fenilglicina apresenta queda na solubilidade com o aumento do pH, enquanto a fenilglicina mantém seu limite de solubilidade, praticamente, constante.

Foram avaliadas a seguir as eficiências de adsorção e seletividades das resinas XAD-4, XAD-7 e XAD-761, a diferentes valores de pH, visando separação entre reagentes não convertidos e produtos em solução. Os resultados obtidos através de ensaios em batelada mostraram que a resina XAD-4 apresentava os melhores valores de seletividade e capacidade de adsorção. Essa resina atingiu uma razão de $\text{ampi/FG} = 7,0$, ou seja, a resina adsorve 7 vezes mais ampicilina do que fenilglicina a pH 8,5. e apresentou capacidade de adsorção máxima de, aproximadamente, 455 mg de ampicilina/g de resina, a pH 6,5. Diferentes modelos de equilíbrio de adsorção foram ajustados aos dados experimentais: os modelos Linear e Langmuir representaram a adsorção de FG e ampicilina sobre a resinas XAD-4 a pH 6,5, respectivamente. Em trabalho paralelo, o grupo definiu-se por processo de produção de ampicilina através de síntese integrada à separação. Nesse processo, ampicilina e fenilglicina são obtidas na forma cristalina, separando-se o biocatalisador por peneiramento. Passou-se a avaliar assim a utilização de um processo combinado de precipitação no ponto isoelétrico e adsorção hidrofóbica para separação e/ou concentração de ampicilina obtida por síntese enzimática, tendo como impureza fenilglicina.

Baseando-se nas propriedades físico-químicas dos compostos, se iniciou o processo de separação pela elevação do pH, visando dissolução de todos os cristais de ampicilina e a menor possível de fenilglicina. Foram avaliados os valores de pH 8,5 e 9,5, sendo o pH 8,5 o escolhido como mais adequado. Através de filtração, fenilglicina pura não dissolvida podia ser obtida. Num segundo estágio, diminuía-se o pH até o ponto isoelétrico da ampicilina visando sua precipitação. Dois ácidos e duas temperaturas foram avaliados nessa etapa, clorídrico e sulfúrico, a 4 e 25⁰C. Os melhores resultados foram obtidos a 4⁰C, não se observando diferenças significativas para os dois ácidos, os quais permitiram atingir graus de pureza acima de 97% para ampicilina, a 4⁰C.

Estudou-se a seguir a separação e/ou concentração da solução mãe, composta de uma mistura de ampicilina e fenilglicina, através de adsorção em leito fixo, contendo a resina XAD-4 que foi previamente selecionada. Inicialmente, foram determinados os coeficientes de transferência de massa e dispersão axial para ampicilina (a baixas concentrações nas quais o modelo linear era ajustado) e fenilglicina, por análise de momento. Foram estudadas também as influências da temperatura, diâmetro médio das partículas da resina, conteúdo de etanol e vazão da fase móvel na performance do sistema. Os resultados obtidos mostraram que a diminuição no diâmetro das partículas, conforme previsto, conduzia a uma melhora significativa na resolução da curva de eluição da fenilglicina e que o aumento na temperatura (na faixa de 5 a 45⁰C) levou a uma diminuição dos tempos de retenção. Os resultados obtidos demonstraram ainda que a coluna foi capaz de separar de forma eficiente uma mistura de ampicilina e fenilglicina alcançando uma resolução de 1,60 para uma vazão de 0,5 mL/min. O aumento do conteúdo de etanol na fase móvel influencia de forma significativa as curvas de eluição dos compostos, facilitando a dessorção de ampicilina; obtendo-se reduções no número de volumes de leito para eluição de 5 e 2 vezes para ampicilina e fenilglicina, respectivamente. Os estudos realizados permitiram assim a proposição do seguinte protocolo para purificação de ampicilina gerada na forma sólida contendo fenilglicina como impureza: Solubilização da mistura de cristais (ampicilina e fenilglicina), obtidos durante a síntese, a pH 8,5; filtração da solução obtendo-se cristais de fenilglicina com alto grau de pureza. Redução do pH da solução (ampicilina em alta concentração e fenilglicina) para precipitação do antibiótico no seu ponto isoelétrico. Concentração da solução mãe por adsorção na resina XAD-4 e eluição com etanol 15% (v/v) de etanol, com retorno da solução concentrada ao reator de síntese.

ABSTRACT

The separation/concentration process of the products obtained from the enzymatic synthesis of ampicillin (AMP) catalyzed by immobilized penicillin G acylase was the focus of this Thesis. Hydrophobic resin adsorption and isoelectric precipitation were the processes herein evaluated. The antibiotic was produced in the solid phase, from 6-aminopenicillanic acid (6-APA) and phenylglycine methyl ester (PGME), and phenylglycine (PG) was an undesired product. The immobilized enzyme was retained in the reactor by a sieve and the precipitated products formed (AMP and PG) were withdrawn and further dissolved at alkaline pH. After a filtration step, PG crystals were retrieved. In a second step, AMP crystals could be obtained by isoelectric precipitation. A combined process for separation/concentration of AMP, using isoelectric precipitation and hydrophobic adsorption, was put forth.

The isoelectric points of the molecules involved in the enzymatic synthesis were determined. In addition, the pH influence (range 5.5-7.5) on the solubility of the compounds was assessed. The results, in accordance with the literature, have shown that a pH increase led to an increase of the solubility of AMP and 6-APA. On the other hand, PGME solubility decreased with pH, while PG solubility was practically constant in this pH range.

The adsorption efficiency and selectivity of three hydrophobic commercial resins XAD-4, XAD-7 and XAD-761 (Rohm and Haas) were evaluated at different pHs for the separation of dissolved products and unconverted reactants. Batch experiments were carried out to determine which resin had higher AMP adsorption capacity and higher selectivity (AMP/PG), at different pHs. XAD-4 was chosen: it presented higher selectivity (maximum AMP/PG = 7,0 at pH 8.5) and adsorption capacity (maximum 455 mg of AMP/g of resin, at pH 6.5). Equilibrium adsorption models were fitted: linear and Langmuir models represented PG and AMP adsorption on XAD-4 resin at pH 6.5, respectively.

In a parallel work, our research group has decided to integrate synthesis and separation (precipitation of the products) in the enzymatic reactor: AMP and PG were in solid phase, and the immobilized enzyme was separated by sieving. Consequently, a combined process using isoelectric precipitation and hydrophobic adsorption to separate/concentrate the AMP coming from enzymatic synthesis, with PG as impurity, was proposed.

Based on the physical-chemical properties of the components, the separation process started by the elevation of pH, aiming at dissolving all AMP crystals, together with a minimum of PG crystals. Better results were obtained using pH 8.5. After filtration, undissolved PG was obtained. In a second step, the pH it was brought to the AMP isoelectric point, causing its precipitation. Two acids and two temperatures were evaluated in this step: chloridric and sulfuric acid, 4 and 25⁰C. Better results were obtained at 4⁰C. No significant difference observed between the two acids. AMP crystals had purity above 97% at 4⁰C.

The following step was the separation/concentration of the mother solution, composed by a mixture of AMP and PG, using in a fixed bed of XAD-4 resin. Previously, adsorption constants, effective diffusion coefficients, and axial dispersion coefficients for AMP (at low concentrations, where a linear adsorption model fits the data) and PG were estimated by analysis of moments. The influence of temperature, flow rate, resin average particle diameter and the presence of ethanol on the performance of the system was assessed. The results obtained have shown that lower resin average particle diameters, as expected, led to a significant improve in the resolution of the elution curve of PG, and higher temperatures decreased retention times. The fixed bed was capable to separate, in an efficient way, a mixture of AMP and PG, reaching a separation resolution of 1.60 using a flow rate of 0.5 mL/min. Increasing ethanol concentration in the mobile phase influenced significantly the elution curves for both components. AMP de-sorption was facilitated and consequently, 5-fold and 2-fold reduction of the bed volume was achieved for AMP and PG, respectively.

These results allowed the proposal of the following protocol for AMP purification, when it is reach in the solid form, containing PG as impurity: solubilization at pH 8,5 of the crystal mixture (AMP and PG), obtained from the antibiotic synthesis. Filtration of the solution, obtaining PG crystals. Reduction of the pH of the solution (containing PG, together with high concentrations of AMP), to precipitate the antibiotic at its isoelectric point. Concentration of the mother solution through adsorption on XAD-4 resin, using a water as mobile phase for adsorption and 15% (v/v) of ethanol for AMP elution. The concentrated solution should be recycled to the synthesis reactor.

1. INTRODUÇÃO

Este trabalho é parte de uma linha de pesquisa, atualmente em andamento no DEQ/UFSCar, que objetiva estudar a produção de antibióticos semi-sintéticos por rota enzimática. Esse abrangente tema de pesquisa inclui: o desenvolvimento de diferentes catalisadores através da imobilização penicilina G acilase de diferentes fontes (incluindo a etapa de produção e purificação dessa enzima de *Bacillus megaterium* selvagem e recombinante), o estudo da cinética enzimática, do transporte de massa e do controle da reação de síntese de antibióticos; a purificação do produto; a síntese do processo e a avaliação, a nível preliminar, da viabilidade econômica deste.

O primeiro antibiótico β -lactâmico semi-sintético, derivado da penicilina G a partir da substituição de sua cadeia lateral, foi a ampicilina (ácido 6-[2-amino-2-fenilacetamido] penicilânico), preparada primeiramente por Doyle em 1961. Após extensas avaliações farmacológicas e antimicrobianas, este antibiótico mostrou-se estável em meio ácido, bem absorvido e efetivo a baixa concentração, para uma ampla variedade de organismos Gram-negativos e Gram-positivos (Hou e Poole, 1969).

A importância dos antibióticos semi-sintéticos, como a ampicilina, decorre de sua maior estabilidade, facilidade de absorção e do fato de originarem menos reações laterais. A rota atual de produção industrial de ampicilina é a síntese química. Tal síntese é complexa, pois envolve a proteção e desproteção de grupos reativos e a utilização de condições extremas de temperatura (-40°C) e de pH, além do emprego de solventes orgânicos tóxicos tais como piridina, dimetilnilina e diclorometano que têm de efluente difícil e caro (Ospina, e colaboradores, 1996).

A síntese enzimática de antibióticos β -lactâmicos vem despertando grande interesse nos últimos anos, devido às enzimas apresentarem grande eficiência catalítica, alta seletividade, elevada especificidade frente ao substrato e condições mais suaves de operação (Bruggink e colaboradores, 1998; Ghosh e colaboradores, 1996; Hernandez-Jústiz e colaboradores, 1999; Kim e Lee, 1996; Boesten, e colaboradores, 1999; Youshko, e

colaboradores, 2000; Clausen e Dekker, 2000). A tecnologia enzimática é uma alternativa interessante tanto sob o ponto de vista ambiental como econômico para a produção de antibióticos semi-sintéticos. No entanto, a literatura indica que a rota enzimática ainda não atingiu rendimento de síntese que supere economicamente o da rota química. Desta forma, a linha de pesquisa em que se insere este trabalho tem sua principal motivação na busca de tornar a rota enzimática mais competitiva, viabilizando a implementação de um processo em nível industrial com menos impacto ao meio ambiente. A separação dos produtos da síntese é uma das etapas do processo que requerem esforço de pesquisa.

Os processos de recuperação de produtos que envolvem etapas de separação, concentração e purificação são, freqüentemente, responsáveis por, pelo menos, metade do custo final de produção dos compostos obtidos, via processos biotecnológicos. Conseqüentemente, a viabilidade econômica dos processos de síntese enzimática de antibióticos semi-sintéticos depende não apenas dos avanços encontrados na etapa de produção, mas também do desenvolvimento e otimização dos processos de separação, purificação e concentração (Ghosh e colaboradores, 1996; Bautista e colaboradores, 1999).

A utilização de adsorventes poliméricos para processos de purificação e para recuperação de compostos a partir de soluções diluídas tem sido estudada com muito interesse nos últimos anos. As principais vantagens da utilização desses adsorventes são sua seletividade e facilidade de regeneração. Os adsorvente poliméricos neutros mais comuns são os co-polímeros de estireno (ou etilvinilbenzeno) e divinilbenzeno. Durante anos, estes adsorventes têm sido desenvolvidos para oferecer a resistência mecânica necessária, apresentarem grandes áreas superficiais para adsorção, e possuírem tamanhos de poros apropriados para um rápido transporte (Chaubal e colaboradores, 1995 ; Grzegorzczk e Carta, 1996). O desenvolvimento de um processo de separação eficiente e seletivo que utilize adsorventes poliméricos requer o conhecimento do efeito das condições de operação (pH, força iônica, temperatura, concentração de composto na corrente de entrada) sobre o fenômeno de adsorção (Ospina e colaboradores, 1996).

Em tese, a adsorção hidrofóbica poderia ser utilizada em diferentes etapas do processo de síntese enzimática de ampicilina e com distintos objetivos. Dependendo da eficiência obtida, da necessidade do processo e obviamente, de sua viabilidade econômica, a adsorção poderia ser usada como um processo de separação e/ou concentração.

O sistema a ser estudado inicialmente era a síntese seguida de separação, ou seja, reagentes não convertidos, produto desejado e indesejado estariam em solução. Propriedades físico-químicas e estudos iniciais de adsorção foram assim realizados para todos os compostos presentes na síntese. Na medida que, em paralelo, o processo global avançava e surgia a perspectiva do uso de um processo de reação integrado com separação, este projeto de doutorado foi também redirecionado para tratar com mais ênfase a separação da mistura de cristais resultante da síntese integrada.

Sendo assim, o objetivo específico deste trabalho foi avaliar a utilização do processo de adsorção em resinas hidrofóbicas (Amberlite XAD-4, Amberlite XAD-7 e Duolite XAD-761) como uma possível etapa a ser utilizada em conjunto com a precipitação por pH na separação e/ou concentração de ampicilina (AMPI) enfocando principalmente a mistura de cristais contendo D-fenilglicina (FG), obtidos na síntese enzimática de ampicilina. Na perspectiva de utilização de uma síntese integrada com separação que vem sendo estudada no processo global, assim sendo, as condições operacionais mais prováveis de serem utilizadas na reação foram enfocadas com destaque neste trabalho.

2. Revisão Bibliográfica

2.1 - ANTIBIÓTICOS β -LACTÂMICOS

Antibióticos são agentes quimioterápicos naturais produzidos por um microrganismo, que em quantidade muito pequena inibem o desenvolvimento de outros microrganismos. Os antibióticos β -lactâmicos incluem penicilinas, monobactâmicos, cefalosporinas e carbapenems. Todos contêm um núcleo básico comum, o *anel β -lactâmico*, que é composto de três átomos de carbono e um átomo de nitrogênio. Estes antibióticos afetam a síntese dos componentes do peptidoglicano da parede celular bacteriana. Sem a proteção da parede celular, a célula provavelmente morrerá por absorção de água, aumento de volume e conseqüente rompimento.

Existem muitas penicilinas diferentes, mas todas têm uma estrutura central denominada *ácido 6-amino penicilânico*, apresentado na Figura 2.1. As diferenças entre as várias penicilinas devem-se às diferenças nas cadeias laterais (parte da molécula além daquela da estrutura central).

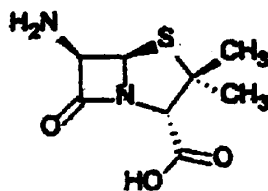


Figura 2.1 - ÁCIDO 6-AMINOPENICILÂNICO (6-APA): ESTRUTURA PRINCIPAL DA PENICILINA G E COMUM A TODAS AS PENICILINAS (PELCZAR E COLABORADORES, 1996).

Comercialmente os principais β -lactâmicos constituem o maior mercado mundial de antibióticos (Figura 2.2). Do total produzido mundialmente, cerca de 5×10^7 kg/ano, o grupo β -lactâmico contribui com 3×10^7 kg/ano. Desde o descobrimento das penicilinas, por Fleming (1929), e das cefalosporinas, por Newton e Abraham (1955), os processos para produção de penicilinas e cefalosporinas naturais e semi-sintéticas têm sofrido várias modificações. Os mecanismos para biossíntese de penicilinas e cefalosporinas são agora

razoavelmente bem conhecidos e os mais importantes β -lactâmicos podem ser agora convenientemente produzidos por processos bioquímicos. Exceto por uma pequena produção de penicilina e oxecilina, nenhum outro antibiótico β -lactâmico é produzido no Brasil, sendo então importados da Índia, China e Venezuela.

2.1.1 - PENICILINAS

A estrutura básica de uma penicilina consiste num anel de tiazolidina, ligado a um anel β -lactâmico que possui um grupo livre. Sua importância está no fato de ser matéria-prima para produção de antibióticos semi-sintéticos pela mudança no radical que está ligado ao grupo amino do 6-APA. (Tomasz, 1979; Pelczar, 1980)

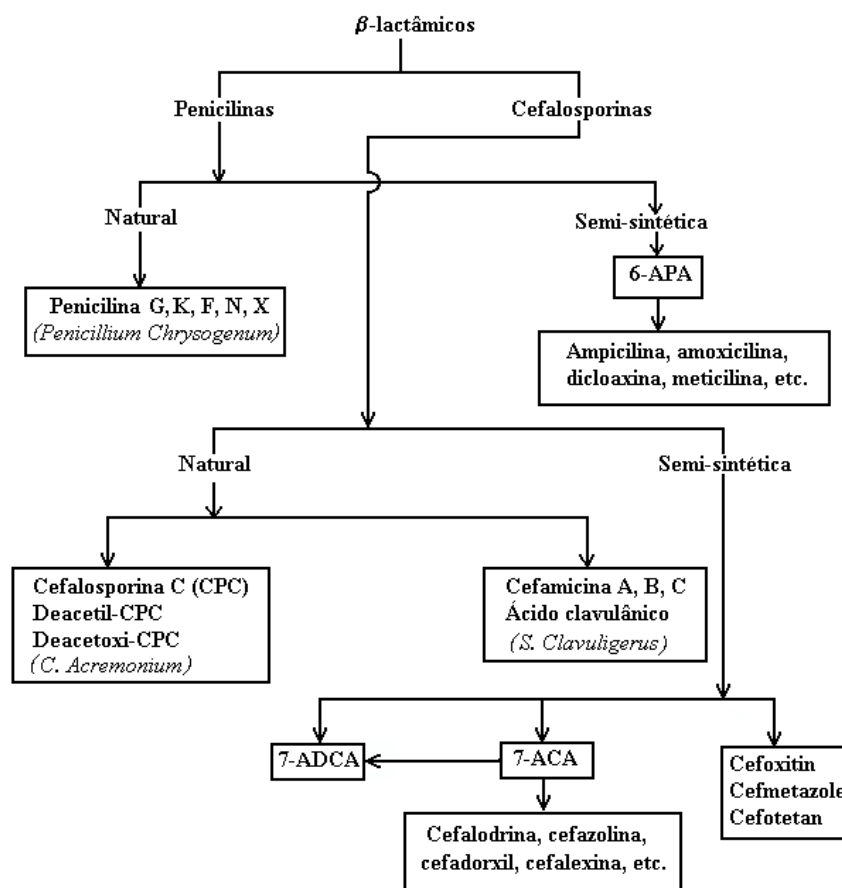


Figura 2.2 - ANTIBIÓTICOS β -LACTÂMICOS COMERCIALMENTE IMPORTANTES (GHOSH E COLABORADORES, 1996)

As penicilinas G e V são as principais penicilinas naturais com utilização clínica e são produzidas biossinteticamente através de processo fermentativo. Ambas apresentam um mesmo espectro de atividade contra bactérias gram-positivas. Apenas a penicilina V é administrada por via oral uma vez que a penicilina G é degradada pelo ácido do estômago, sendo portanto administrada por via intramuscular.

A penicilina é o antibiótico mais amplamente utilizado, sendo produzida por um mutante do fungo *Penicillium chrysogenum*. O termo penicilina é genérico para todo grupo de penicilinas naturais e semi-sintéticas. (Pelczar, 1980)

2.1.2 - PENICILINAS NATURAIS

As penicilinas que são produzidas totalmente por microrganismos são denominadas **penicilinas naturais**. Estes antibióticos são produzidos por certas espécies de fungos do gênero *Penicillium*. As duas mais importantes deste grupo são a penicilina G e a Penicilina V. A estrutura básica da penicilina G é um anel tiazolidina (I) conectado a um anel β -lactâmico (II), ao qual uma cadeia lateral (R) está fixa, representados na Figura 2.3. Alterações químicas ou metabólicas nestes núcleos causa inativação. A única penicilina natural hoje no mercado é a benzilpenicilina (Marzo e Dal Bo, 1998). Este antibiótico é ainda muito utilizado quando se deseja um rápido efeito ou quando há necessidade de altas concentrações no plasma sanguíneo. A maioria das penicilinas, no entanto, são destruídas no estômago pelo suco gástrico e não são, portanto, adequadas para administração oral (Nathwani e Wood, 1993).

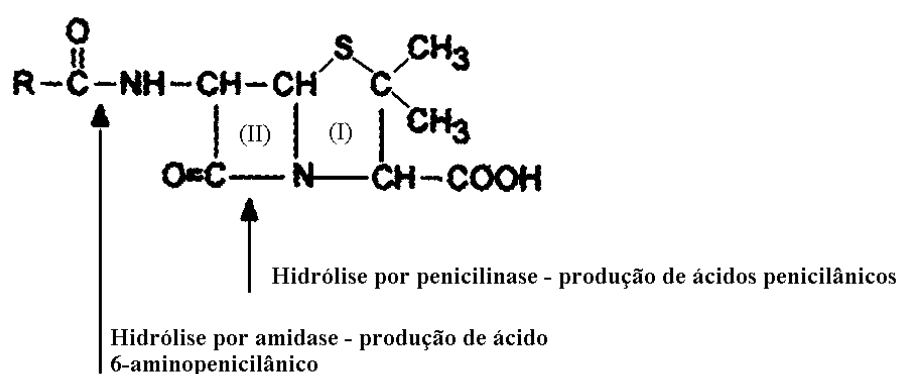


Figura 2.3 - - ESTRUTURA MOLECULAR DA PENICILINA G

As penicilinas naturais podem ser destruídas por enzimas denominadas penicilinasas. Estas enzimas destroem o anel β -lactâmico do núcleo básico da molécula e por esta razão são também denominadas β -lactamases. A abertura desse anel impede a penicilina de atuar no bloqueio da formação da parede celular de bactérias, não combatendo assim a infecção. Bactérias que produzem a enzima penicilinase são assim resistentes a antibióticos β -lactâmicos

2.1.3 - PENICILINAS SEMI-SINTÉTICAS (SSPS)

Em 1959, o ácido 6-aminopenicilânico (6-APA) foi descoberto e sintetizado em quantidades apreciáveis, o que serviu como ponto de partida para a síntese química de diversos derivados da penicilina (Nathwani e Wood, 1993). O núcleo, ácido 6-aminopenicilânico, pode ser produzido em grande quantidade por hidrólise enzimática de penicilina G ou penicilina V. É possível adicionar a este anel central uma grande variedade de diferentes cadeias laterais, criando novos tipos de penicilinas que não são encontradas na natureza. Essas novas penicilinas são denominadas *penicilinas semi-sintéticas*, e algumas apresentam vantagens sobre as penicilinas naturais. Por exemplo, a feneticiclina, umas das primeiras penicilinas semi-sintéticas produzidas para uso clínico, é mais facilmente absorvida que a penicilina V.

2.1.4 - AMPICILINA

O primeiro antibiótico β -lactâmico semi-sintético, derivado da penicilina G a partir da substituição de sua cadeia lateral, foi a ampicilina (ácido 6-[2-amino-2-fenilacetamido] penicilânico), (Figura 2.4) preparada primeiramente por Doyle em 1961. Após extensas avaliações farmacológicas e antimicrobianas, este antibiótico mostrou-se estável em meio ácido, bem absorvido e efetivo a baixa concentração, para uma ampla variedade de organismos Gram-negativos e Gram-positivos (Hou e Poole, 1969).

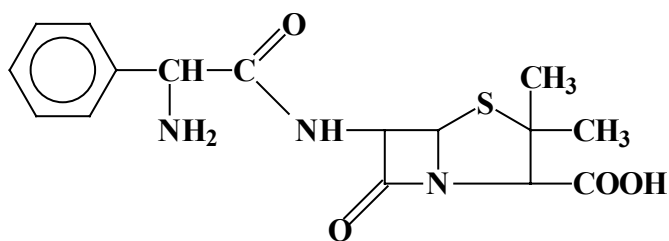


Figura 2.4 - ESTRUTURA DA AMPICILINA

A ampicilina deve sua atividade e estabilidade aparentemente à presença do grupo amino livre na posição α da cadeia lateral. Normalmente a produção de ampicilina por síntese química envolve um processo complexo que requer a proteção do grupo α -amino de fenilglicina. Requer ainda o uso de derivados altamente reativos da fenilglicina (instáveis), condições anidras, temperaturas muito baixas, e o uso de compostos altamente tóxicos (piridina, dimetilanelina e dicolorometano) na separação do produto, já que a síntese resulta numa mistura final complexa, (Crocchi e colaboradores, 1980; Cowley e colaboradores, 1976).

No Brasil, os antibióticos respondem pela maior parte do faturamento da indústria farmacêutica – cerca de 68% – e têm sido um dos maiores responsáveis pela elevação significativa dos preços de medicamentos no mercado brasileiro (Folha de São Paulo, caderno 3, 15 de março de 2000). Por exemplo, em 2000 foram colocados no mercado brasileiro 130 toneladas de ampicilina, proveniente de 61 laboratórios (www.abifarma.com.br). O consumo nacional, entretanto, está ainda represado, em virtude do baixo poder aquisitivo de grande parcela da população. Tanto assim que a ampicilina faz parte do programa *Farmácia Básica*, de distribuição gratuita de medicamentos, do governo federal (www.saude.gov.br/programas/farmacia), o que atesta a importância desse fármaco.

A Tabela 2.1 traz um resumo das importações de ampicilina pelo Brasil entre 2001 e 2002 (alicesweb.mdic.gov.br).

Tabela 2.1 - AMPICILINA: IMPORTAÇÕES PELO BRASIL DE PRINCÍPIOS ATIVOS E MEDICAMENTOS FORMULADOS EM 2001-2002

Antibiótico	Toneladas (ano)	US\$ x 10 ⁻⁶	Maiores exportadores (% em peso)
Ampicilina (sais)	114 (2001)	4,6	Espanha (37%) México (28%) Índia (28%)
	108 (2002)	4,4	México (59%) Índia (22%) Espanha (15%)
Ampicilina (medicamentos)	202 (2001)	7,3	Índia (42%) Venezuela (20%) Áustria (20%) França (9%)
	197 (2002)	5,9	Índia (64%) Venezuela (16%) Itália (7%) China (5%)

2.1.5 - ESTRATÉGIAS DE SÍNTESE ENZIMÁTICA DE ANTIBIÓTICOS β -LACTÂMICOS

Na abordagem química tradicional, o produto de fermentação penicilina G é transformado em ácido 6-amino penicilânico (6-APA) em procedimento baseado na formação de uma amida clorídrica. Esse procedimento distingue de forma adequada entre a amida secundária a ser hidrolisada e a amida terciária altamente labil do anel β -lactâmico. Por outro lado, o ácido 7-ADCA, um intermediário de duas das mais importantes cefalosporinas semi-sintéticas (SSCs), pode ser obtido por expansão oxidativa do anel de tiazolidina da penicilina G, seguido por uma similar deacilação. Subseqüentemente, 6-APA e 7-ADCA são transformados em SSPs e SSCs, respectivamente, por condensação com D-(-)fenilglicina ou D-(-)-4-hidroxifenilglicina (Bruggink e colaboradores, 1998).

Com o tempo, muitas companhias substituíram a hidrólise química da cadeia lateral, que necessitavam de produtos químicos perigosos e solventes tais como fósforo pentaclorídrico e diclorometano, pela hidrólise catalisada por penicilina acilase em meio

aquoso. Apesar da conversão microbiana de penicilina G em 6-APA ser conhecida há quase 5 décadas, a aplicação industrial da enzima envolvida, penicilina acilase (penicilina amidase, penicilina aminohidrolase EC 3.5.1.11) foi introduzida com sucesso apenas nos últimos anos. Esse é primeiramente um resultado do fato de que a produção eficiente da enzima e sua recuperação não estavam disponíveis há uma década atrás (Bruggink e colaboradores, 1998).

Geralmente dois tipos de enzimas podem ser distinguidos. As penicilinas acilases, de origem microbiana ou fúngica, apresentam preferência por ácido fenilacético ou ácido fenoxacético e seus derivados tolerando pequenos substituintes na posição α (amino, hidróxi, metil, cloro) e no anel aromático. Outros ácidos acéticos aromáticos derivados também são reconhecidos. A penicilina acilase está largamente distribuída entre bactérias, leveduras e fungos filamentosos. Essa enzima quando produzida por *E. coli*, é um heterodímero com uma subunidade α de 20.5 kDa e β de 69.5 kDa. A estrutura cristalina da penicilina acilase de *Escherichia coli* a 1.9Å de resolução indica que o centro ativo catalítico é o resíduo serina N-terminal da subunidade β (Bruggink e colaboradores, 1998).

2.2 - PRODUÇÃO DE ANTIBIÓTICOS SEMI-SINTÉTICOS

Atualmente, a produção industrial de ampicilina e outros antibióticos semi-sintéticos é feita por rota química, processo caro e complexo pois envolve temperaturas abaixo de zero (-25°C), a proteção/desproteção de grupos reativos e o uso de solventes orgânicos tóxicos, tal como cloreto de metileno (Ospina e colaboradores, 1996(a)). Apesar do alto rendimento, esses processos químicos têm sido criticados pois esses solventes organoclorados podem ser cancerígenos, sendo indesejáveis tanto como resíduo, como enquanto impureza presente no produto, mesmo como traços (Diago e colaboradores, 1998b).

Estão disponíveis em literatura diversas patentes sobre a produção de antibióticos β -lactâmicos, tais como ampicilina, amoxicilina, cefradroxil, cefalexina entre outros. Duas rotas são normalmente descritas: a síntese química e a síntese enzimática. Atualmente, a síntese química continua a ser majoritariamente utilizada industrialmente e possui um alto rendimento, em torno de 80%. As patentes que tratam da rota química se concentram nas

décadas de 70 e 80, enquanto as que tratam da rota enzimática, na década de 90. Essa maior concentração de patentes sobre a síntese enzimática de antibióticos β -lactâmicos na última década vem a refletir o crescente interesse no processo enzimático, visando a substituição da rota química. Esse interesse se deve ao fato de que as enzimas, como, por exemplo, a penicilina G acilase (PGA), possuem alta seletividade, especificidade e atividade em condições amenas de reação (meio aquoso, pH neutro e temperaturas moderadas).

A rota enzimática de produção de amoxicilina, ampicilina e cefalexina, por exemplo, a partir de 6-APA puro e um derivado de D-fenilglicina (como por exemplo, um alquil éster) é conhecida desde a patente germânica nº 2.163.792. No entanto, até o presente momento, ao nosso conhecimento, apenas a produção de cefalexina foi implementada em escala industrial.

As informações sobre os processos de produção de antibióticos beta lactâmicos são muito restritas, e fornecem poucos detalhes. Pode-se entender o motivo dessa restrição de informações, pois está em jogo um mercado de bilhões de dólares no mundo todo. Mesmo as patentes mais específicas não fornecem os detalhes de como purificar o antibiótico formado, sendo essa informação via de regra especificada apenas como “o antibiótico foi separado e purificado a partir do meio reacional por métodos conhecidos na literatura”. Sendo assim, a busca pelo melhor processo de purificação ou seqüência de purificação da ampicilina produzida via rota enzimática, passa necessariamente por um trabalho que visa encontrar entre as muitas técnicas conhecidas, qual, ou quais, mais se adapta às características do meio reacional e do antibiótico produzido.

2.2.1 - SÍNTESE ENZIMÁTICA DE AMPICILINA

Embora a síntese enzimática da ampicilina seja conhecida desde 1969, o baixo rendimento e concentração de ampicilina obtidos têm impedido que o processo enzimático alcance estágio comercial (Ospina e colaboradores, 1996 (a)). Nosso grupo de trabalho pretende alcançar um estágio de desenvolvimento tecnológico que permita realizar a síntese de antibióticos em reatores industriais. Para isso, precisa-se conhecer os diversos parâmetros de interesse industrial.

Cada uma das variáveis que define o meio reacional (pH, temperatura, natureza e concentração dos solventes, entre outros) tem efeitos diferentes sobre cada um dos parâmetros, por isso as condições ótimas de reação serão estabelecidas não por meio da

otimização de apenas um dos parâmetros de interesse, mas buscando as faixas de condições que permitam obter simultaneamente bons valores em todos os parâmetros industriais do processo enzimático.

A síntese enzimática de antibióticos semi-sintéticos teoricamente pode ser feita por duas vias: a termodinamicamente controlada, onde temos simplesmente a reação reversa da hidrólise, e a cineticamente controlada, onde usamos um reagente previamente ativado para promover a acilação do núcleo β -lactâmico.

2.2.2 - SÍNTESE TERMODINAMICAMENTE CONTROLADA

Dos pontos de vista (teórico, prático, econômico), a síntese termodinamicamente controlada seria a melhor estratégia (Fernandez-Lafuente, 1991). Neste caso haveria a condensação direta do doador de acil (fenilglicina) e do núcleo antibiótico (6-APA). A reação inversa seria a hidrólise da ampicilina formada. O rendimento máximo a ser obtido com essa rota é fixado pelo equilíbrio termodinâmico.

Esta rota é a mais simples para se obter produtos de condensação pois:

- É uma reação direta entre carboxila e amida, tornando desnecessária a ativação do doador de acil (requerida na síntese cineticamente controlada);
- Os rendimentos obtidos são estáveis e constantes;
- Pode-se conseguir rendimentos de 100% em relação ao substrato mais caro ou instável, utilizando um excesso do outro substrato;
- Simplifica-se o processo de purificação, pois só é necessário separar o produto do substrato em excesso.

Apesar de todas as vantagens mencionadas essa estratégia requer o uso de solventes orgânicos, que provocam efeitos negativos sobre as propriedades das enzimas (Sadvice, 1984; Mc Dougall e colaboradores, 1982; Svedas e colaboradores, 1980 (a)). A presença destes solventes orgânicos é imprescindível em sistemas monofásicos já que diminuem a concentração de água, produto da hidrólise do antibiótico, favorecendo assim o equilíbrio na direção da síntese do antibiótico. Além disso, favorece a presença de substrato na forma não

iônica, forma reativa, através do aumento do pK dos grupos carboxílicos da fenilglicina, por exemplo.

Além disso, existem dois sérios inconvenientes nessa rota. O primeiro, de natureza cinética, está relacionado com a dificuldade da PGA de *E. coli* ligar-se a formas carregadas de substratos (Margolin e colaboradores, 1980). Para que o substrato seja reconhecido e o sítio hidrofóbico se “abra”, a fenilglicina deveria ter os grupos carboxil e amino descarregados. Entretanto, dada a diferença entre os respectivos pK's, não haverá nenhum pH em que seja apreciável a concentração de moléculas nessa situação. Quando o grupo carboxil da fenilglicina não está ionizado, seu grupo amino está na forma NH_3^+ . Ao se aumentar continuamente o pH do meio, a fenilglicina perde primeiro o hidrogênio do grupo carboxil para depois perder o hidrogênio do grupo amino. Esta peculiaridade da PGA de *E. coli* é um obstáculo importante na síntese direta (ou “termodinamicamente controlada”) de antibióticos β -lactâmicos que contenham um grupo amino ligado ao carbono α , como é o caso da ampicilina.

O segundo inconveniente é de natureza termodinâmica: em meio aquoso o equilíbrio da reação está fortemente deslocado no sentido da hidrólise. Assim, há em tese três opções para melhorar os rendimentos da síntese termodinâmica: usar PGA's de outra origem microbiana, diminuir a concentração de água (a reação será deslocada no sentido da síntese) ou favorecer a presença de substrato na forma não-iônica, atuando sobre as constantes de dissociação.

Uma forma de contornar esses problemas é a substituição da fenilglicina por um derivado, geralmente um éster ou uma amida. Com este procedimento elimina-se o radical carboxil que, desprotonado, prejudica o reconhecimento do substrato pela PGA de *E. coli*. A reação a partir desses derivados é denominada “cineticamente controlada”.

2.2.3 - SÍNTESE CINETICAMENTE CONTROLADA

A síntese cineticamente controlada tornou-se uma das estratégias mais populares na literatura científica (Cole, 1969; Kasche e colaboradores, 1987, Konecny e colaboradores, 1983). Substituiu-se a FG por derivados ativos, como ésteres e amidas. Kasche, 1986, Fernandez-Lafuente, 1991, relataram que o éster metílico de fenilglicina (EMFG) obteve rendimentos mais altos que as amidas. A Figura 2.5 mostra a síntese de ampicilina

cineticamente controlada a partir de EMPG e 6-APA. Note-se que essa rota apresenta uma nova reação paralela, indesejada: a formação de ácido fenilacético e metanol pela hidrólise do éster. Além disso, a ampicilina produzida pode, também, ser hidrolisada em FG e 6-APA.

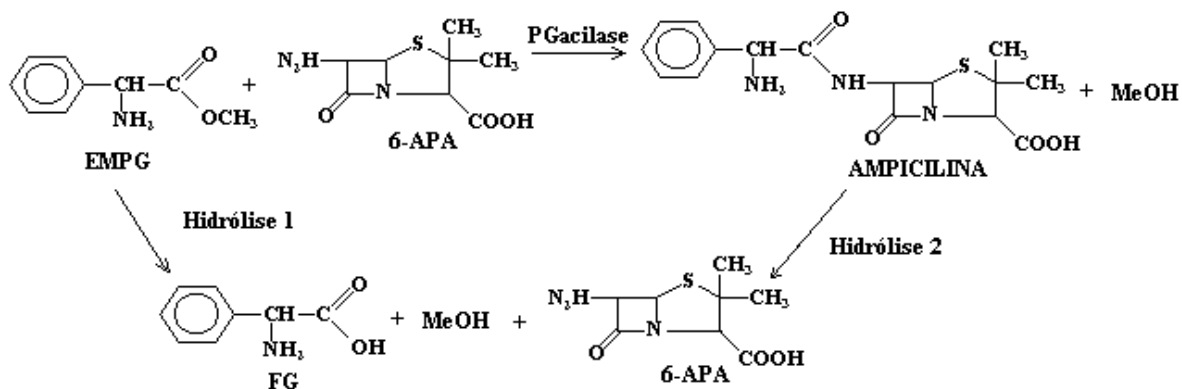


Figura 2.5 - SÍNTESE DE AMPICILINA CINETICAMENTE CONTROLADA.

Na rota cineticamente controlada, o rendimento máximo a ser obtido dependerá das velocidades relativas de hidrólise do substrato ativado (éster ou amida), de hidrólise do antibiótico obtido e de síntese do antibiótico (reação desejada). Uma vez que nesse sistema série-paralelo as três reações dependem de forma diferente do pH, temperatura e concentração de reagentes e produtos, o rendimento máximo possível será função das condições em que se opera a reação, que afetarão de forma distinta as cinéticas das três reações.

De acordo com Fernandez-Lafuente, 1991, é necessário que o nucleófilo se encontre adsorvido no centro ativo da enzima antes da formação do acil-enzima, já que a concentração de água é extremamente maior que a de 6-APA. Assim, se o nucleófilo não estiver já posicionado quando a enzima encontrar o éster, o complexo acil-enzima formado será desacilado pela água formando fenilglicina. A formação do complexo acil-enzima também ocorre com o antibiótico; a alta concentração de água promove a desacilação do intermediário liberando fenilglicina e 6-APA, e novamente regenerando a enzima.

A rota cineticamente controlada é mais complexa que a anterior, mas tem características interessantes tais como condições suaves de reação, velocidades de reação mais elevadas, os rendimentos mais elevados que os obtidos na rota termodinamicamente controlada, rendimentos dependem das propriedades da enzima, dos substratos e das condições experimentais (pH, temperatura, força iônica, presença de solventes orgânicos).

Estas características indicam que os resultados experimentais obtidos pela síntese cineticamente controlada dependem fundamentalmente das características do meio e da enzima. Assim, deve-se analisar os experimentos integrando todos os fatores que influenciam no rendimento da reação.

2.3 - PROCESSOS DE SEPARAÇÃO APLICADOS À BIOTECNOLOGIA

Um grande número de processos de separação pode ser usado em sistemas biotecnológicos, dos quais filtração, centrifugação, extração, adsorção, cromatografia, precipitação, eletroforese, cristalização e filtração com membranas são os mais importantes. Novos processos tais como pervaporação e membranas líquidas oferecem ainda novas possibilidades na recuperação de produtos. Além disso, a combinação de separação com membranas e fermentação em bioreator acoplado a membrana conduzem a novos conceitos na bioengenharia (Howell, Sanchez e Field, 1993).

Para escolha de um determinado processo de separação, deve-se primeiro especificar as exigências para sua aplicação. Alguns aspectos específicos que podem ser distinguidos em bioseparações são:

- Os bioprodutos devem ser recuperados a partir de soluções aquosas muito diluídas. Embora as concentrações possam ser relativamente altas como nas fermentações alcólicas, do ácido cítrico e do acético (na faixa de moles/litro), no caso de produtos de alto valor, tais como enzimas, antibióticos e vitaminas, as concentrações são consideravelmente menores. A recuperação e purificação destes produtos é muito cara, especialmente em termos de consumo de energia.
- Uma segunda característica é a grande variedade de produtos são produzidos, o que resulta em grandes problemas de separação. Os vários produtos diferem muito em tamanho e natureza química. Além dos sólidos suspensos e solutos coloidais (por exemplo, leveduras, fungos, bactérias), uma grande variedade de produtos com diferentes pesos moleculares, solutos macromoleculares (por exemplo, proteínas, polissacarídeos, ácidos nucleicos) e solutos de baixo peso molecular (por exemplo, sais, ácidos orgânicos, aminoácidos,

antibióticos) são produzidos. A Tabela 2.2 mostra uma visão geral das dimensões aparentes de pequenas partículas, moléculas e íons.

- Os bioprodutos são muito sensíveis a temperatura, pH e solventes. Isto significa, por exemplo, que a destilação, uma técnica frequentemente usada na indústria química, não pode ser usada em bioseparações.
- Os bioprodutos são, na maior parte, produtos de alto valor e técnicas de separação que previnam as perdas do mesmo são requeridas (Howell, Sanchez e Field, 1993).

Apesar da Biotecnologia ter sido desenvolvida durante a última metade do século, particularmente com a produção de antibióticos e aminoácidos, a consequência do progresso em Engenharia Genética, o qual é conhecida como a “Nova Biotecnologia”, trouxe uma visão completamente diferente para este campo. Essa mudança pode ser percebida numa nova perspectiva para o que era conhecido há poucos anos atrás, como tecnologia de fermentação. O reator biológico não recebe mais a prioridade de estudo, o campo agora está claramente dividido em três partes, e o que acontece dentro do sistema de cultura ou fermentador divide a importância com o conjunto de operações “upstream” e “downstream” (Leser e Ansenjo, 1994).

Tabela 2.2 - DIMENSÕES APARENTES DE PEQUENAS PARTÍCULAS, MOLÉCULAS E ÍONS

Espécies	Faixa de Dimensões (nm)
Fungos e leveduras	1000 - 10000
Bactérias	300 - 10000
Emulsões oleosas	100 - 10000
Sólidos coloidais	100 - 1000
Vírus	30 - 300
Proteínas/polissacarídeos (PM: $10^4 - 10^6$)	2 - 10
Enzimas (PM: $10^4 - 10^5$)	2 - 5
Antibióticos (PM: 300 - 1000)	0.6 - 1.2
Moléculas orgânicas (PM: 30 - 500)	0.3 - 0.8
Íons inorgânicos (PM: 10 - 100)	0.2 - 0.4
Água (PM: 18)	0.2

Fonte: Beaton, 1980 apud Howell, Sanchez e Field, 1993

Os antibióticos β -lactâmicos produzidos pela rota fermentativa são geralmente recuperados via uma série de operações em processos “downstream” os quais podem variar dependendo das propriedades dos antibióticos assim como de seus processos subsequentemente requeridos. Tradicionalmente, as operações incluem separações sólido/líquido, extração de caldo filtrado e cristalizações de antibióticos em pontos isoelétricos.

A mudança de perspectiva seguindo a nova biotecnologia sugere uma direção diferente. Os produtos geralmente têm um importante valor comercial, devido não somente a relação intrínseca associada com pequeno volume de produto com alto valor mas também devido à maior parte deles estarem num importante e rápido crescimento na classe de drogas. De 1981 a 1996, 40 produtos farmacêuticos, incluindo 20 terapêuticos foram aprovados pela U.S. Food and Drug Administration e 143 outros medicamentos e vacinas estão em andamento para regulamentação, (Verral, 1996).

As etapas de separação e purificação de produtos após fermentação, chamadas processos “downstream”, são provavelmente os elementos mais críticos dos processos biotecnológicos modernos.

2.3.1 - CARACTERÍSTICAS DAS BIOSEPARAÇÕES

Uma característica marcante da biotecnologia é a imensa variedade de produtos que são produzidos. Enquanto uma companhia petroquímica fabrica cerca de 10 produtos, uma companhia de medicamentos ou drogas produz mais de 200. A diversidade destes produtos pode ser ilustrada na Tabela 2.3. Esta diversidade de produtos gera um amplo espectro de métodos de separação usados (Belter e colaboradores, 1988).

Tabela 2.3 - TIPOS DE MOLÉCULAS PRODUZIDAS EM BIOTECNOLOGIA (BELTER E COLABORADORES, 1988)

Tipo de molécula	Número de espécies
Antibióticos	85
Aminoácidos	18
Enzimas	15
Ácidos orgânicos e solventes	11
Vitaminas, leveduras, fator de crescimento, nucleotídeos	6
Dextranas, biooxidações de esteróides	8

Essa diversidade de produtos gera um grande espectro de possíveis métodos a serem aplicados para processos de separação. Deste modo, a busca por processos de bioseparação mais eficientes dirigiu-se às diferenças nas propriedades físico-químicas dos produtos desejados.

O desenvolvimento de novos e eficientes processos de separação está baseado na exploração mais eficiente das diferenças das propriedades físico-químicas do produto – tais como carga superficial/ curva de titulação, hidrofobicidade superficial, peso molecular, bioespecificidade com respeito a ligantes específicos – comparadas com aquelas dos componentes contaminantes do meio. Os principais fatores físico-químicos envolvidos no desenvolvimento de processos de separação estão mostrados na Tabela 2.4. Algumas propriedades (por exemplo, carga e afinidade) conseguem apresentar resoluções extremamente altas nas operações de purificação enquanto que outras (como peso molecular) mostram resoluções mais baixas (Garside, 1996).

Tabela 2.4 - PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS PARA O DESENVOLVIMENTO DE PROCESSOS DE SEPARAÇÃO (GARSIDE, 1994)

Propriedade Físico-química	Processo de Separação
Carga	Cromatografia de troca iônica Eletrodialise Partição em sistema aquoso bifásico
Hidrofobicidade	Cromatografia de interação hidrofóbica Precipitação Partição em sistema aquoso bifásico
Ligação Específica	Cromatografia de Afinidade
Tamanho	Filtração em Gel Ultrafiltração Diálise
Mobilidade Elétrica	Eletroforesi
Ponto Isoelétrico	Chromatofocusing Precipitação no ponto isoelétrico
Taxa de Sedimentação	Centrifugação
Atividade Superficial	Adsorção
Solubilidade	Extração sólido-líquido Extração com fluido supercrítica

2.3.2 - PRECIPITAÇÃO NO PONTO ISOELÉTRICO

A titulação é a adição ou a remoção gradual de prótons. A Figura 2.6 mostra a curva de titulação da forma diprótica da glicina. Cada molécula e base adicionada resulta na remoção de um próton de uma molécula do aminoácido. A curva apresentada na Figura 2.6 tem dois estágios distintos, cada um deles correspondendo à remoção de um próton da glicina. Cada um dos dois estágios lembra, na forma, a curva de titulação de um ácido monoprotico, como o ácido acético e pode ser analisado da mesma maneira. Em pH muito baixo, a espécie iônica predominante da glicina é $^+H_3N-CH_2-COOH$, a sua forma totalmente protonada. No ponto médio do primeiro estágio da titulação, no qual o grupo $-COOH$ da glicina perde o seu próton, estão presentes concentrações equimolares da forma doadora de prótons ($^+H_3N-CH_2-$

COOH) e da forma receptora de prótons ($^+\text{H}_3\text{N}-\text{CH}_2-\text{COO}^-$). No ponto médio da titulação Figura 2.7, o pH é igual ao pKa do grupo protonado que está sendo titulado. Para a glicina, o pH no ponto médio é 2,34, assim o seu grupo $-\text{COOH}$ tem um pKa de 2,34 (pH e pKa são simplesmente notações convenientes para a concentração de prótons e para a constante de equilíbrio de ionização, respectivamente). O pKa é uma medida da tendência do grupo para ceder o próton, com esta tendência decrescendo 10 vezes quando o pKa aumenta de uma unidade). À medida que a titulação prossegue, outro ponto importante é atingido quando o pH assume o valor 5,97. Ali há um ponto de inflexão, no qual a remoção do primeiro próton da glicina está essencialmente completa e a remoção do segundo segundo próton apenas começou. Nesse pH a glicina está presente principalmente como o íon dipolar $^+\text{H}_3\text{N}-\text{CH}_2-\text{COO}^-$. Mais adiante será explicado o significado desse ponto de inflexão na curva de titulação (Lehninger e colaboradores, 1995). As espécies iônicas predominantes nos pontos críticos da titulação estão mostradas abaixo:

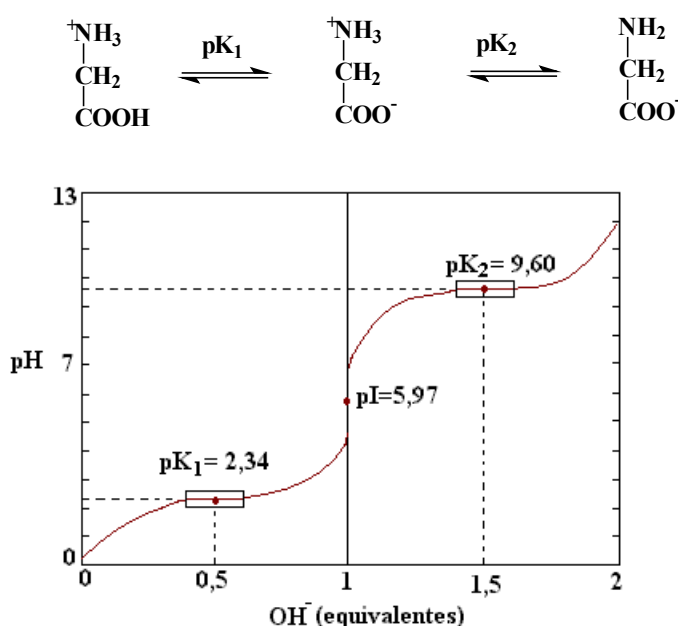


Figura 2.6 - CURVA DE TITULAÇÃO DE UMA SOLUÇÃO DE GLICINA 0,1M A 25°C. OS RETÂNGULOS CENTRADOS AO REDOR DE PKs INDICAM AS REGIÕES DE GRANDE CAPACIDADE DE TAMPONAMENTO, (LEHNINGER E COLABORADORES, 1995).

O segundo estágio da titulação corresponde à remoção de um próton do grupo NH_3^+ da glicina. O pH no ponto médio deste estágio é 9,60, igual ao pKa para o grupo NH_3^+ . A

titulação está completa em um pH perto de 12, neste ponto a forma predominante da glicina é $\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{COO}^-$ (Lehninger e colaboradores, 1995).

Da curva de titulação da glicina pode-se retirar várias informações importantes. Primeiro, ela fornece uma media quantitativa do pKa de cada um dos grupos ionizáveis, 2,34 para o grupo $-\text{COOH}$ e 9,60 para o grupo $-\text{NH}_3^+$. Deve ser notado que o grupo carboxila da glicina é, pelo menos, 100 vezes mais ácido (isto é, tem maior facilidade em se ionizar) do que o grupo carboxila do ácido acético, o qual tem um pKa de 4,76. Esse efeito é causado pela vizinhança do grupo amino carregado positivamente no átomo de carbono α , como descrito na Figura 2.7.

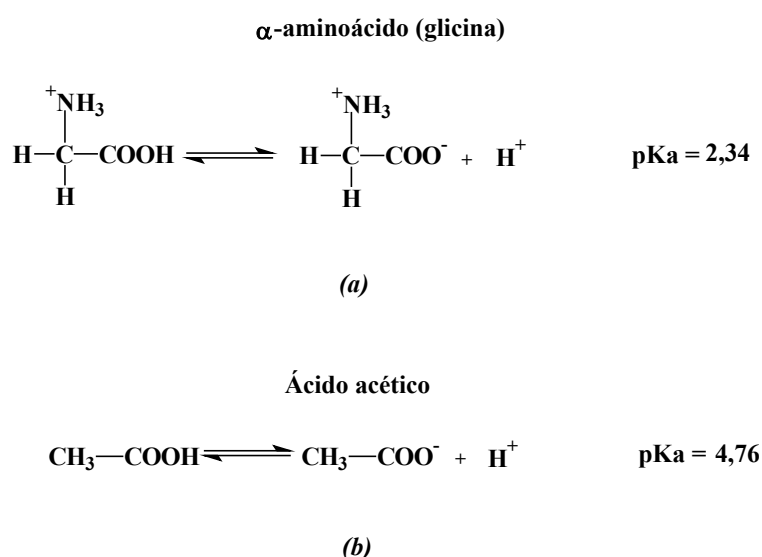


Figura 2.7 - (A) INTERAÇÕES ENTRE OS GRUPOS α -AMINO E α -CARBOXÍLICOS EM UM α -AMINOÁCIDO. A CARGA POSITIVA DO GRUPO $-\text{NH}_3^+$, PRÓXIMO DO GRUPO CARBOXÍLICO, TORNA A IONIZAÇÃO MAIS FÁCIL (ISTO É, DIMINUI O pKa DO $-\text{COOH}$). (B) O pKa NORMAL PARA O GRUPO CARBOXÍLICO É APROXIMADAMENTE 4,76, SEMELHANTE À DO ÁCIDO ACÉTICO (LEHNINGER E COLABORADORES, 1995).

A Segunda informação dada pela curva de titulação da glicina (Figura 2.6) é que este aminoácido tem duas regiões de poder tamponante. Uma das porções relativamente planas da curva centrada ao redor do primeiro pKa de 2,34 indica que a glicina é um bom tampão próximo deste pH. A outra zona de tamponamento estende-se por aproximadamente 1,2 unidades de pH centradas ao redor de 9,60 (Lehninger e colaboradores, 1995).

2.3.2.1 - CÁLCULO DO PONTO ISOELÉTRICO

Outra informação importante derivada da curva de titulação de um aminoácido é a relação entre a sua carga elétrica líquida e o pH da solução. Em pH 5,97, o ponto de inflexão entre os dois estágios da sua curva de titulação, a glicina está presente como a sua forma dipolar, totalmente ionizada, porém sem carga elétrica líquida (Figura 2.7). Este pH característico é chamado de ponto isoelétrico ou pH isoelétrico e é designado pI ou pH_I. Para um aminoácido com a glicina, que não tem grupos ionizáveis na cadeia lateral, o ponto isoelétrico é a média aritmética dos dois valores de pK_a:

$$pI = \frac{1}{2} (pK_1 + pK_2)$$

para o caso específico da glicina, o ponto isoelétrico é :

$$pI = \frac{1}{2} (2,34 + 9,60) = 5,97$$

Tanto a ampicilina como a fenilglicina apresentam características aminoácidas, ou seja, apresentam grupos amino e ácido na sua estrutura. Logo, torna-se importante o conhecimento destas características para auxiliar a etapa de purificação do antibiótico.

No caso específico de separação da ampicilina a partir da mistura de cristais de ampicilina e fenilglicina, obtida via síntese enzimática cineticamente controlada, é de fundamental importância o conhecimento dos valores de pKs e pIs de ambos compostos, pois sabe-se que tanto a ampicilina como a fenilglicina, apresentarão suas menores solubilidades nos valores de pH dos seus pontos isoelétricos. Aliado a este aspecto, o pH tem especial importância quanto a sua influência na variação da solubilidade dos compostos, por isso é importante determinar como varia a curva de solubilidade de cada composto contra o pH. Devido a estes aspectos, a precipitação no ponto isoelétrico pode ser considerada uma estratégia interessante para purificação de ampicilina produzida enzimaticamente.

Boesten e colaboradores, 1999 estudaram a recuperação de ampicilina produzida pela síntese enzimática de EMFG (Ester metílico de fenilglicina) e 6-APA (Ácido 6-amino penicilânico) com a enzima PGA imobilizada. A partir da mistura de cristais de ampicilina e

fenilglicina obtidos durante a reação de síntese, os autores utilizaram uma sequência de variação no pH de forma que primeiramente fosse solubilizada toda ampicilina que havia sido cristalizada, esse efeito foi alcançado elevando-se o pH acima de 8,6. Posteriormente, essa solução foi filtrada e o resíduo lavado. Este resíduo era uma mistura de enzima e fenilglicina formada. O filtrado foi acidificado a pH 6,8. Após as etapas de filtração, lavagem e secagem dos cristais obtidos, os autores obtiveram ampicilina tri-hidratada com uma pureza química maior que 98% (em base seca).

A solução restante da cristalização da ampicilina foi acidificada a pH 4,6. A mesma sequência de filtração, lavagem e secagem foi aplicada a solução. O material sólido obtido continha uma mistura de 6-APA e ampicilina na taxa molar de 94:6.

Esta forma de purificação da ampicilina a partir de uma mistura de cristais obtida durante a síntese ilustra bem a importância do conhecimento prévio de como se comporta a solubilidade da substância com o pH. Neste exemplo específico, sabe-se que a ampicilina apresenta aumento da solubilidade com o pH, enquanto a fenilglicina mantém praticamente a solubilidade. Da mesma forma, a acidificação da solução a pH 4,6 foi proposital pois neste pH estamos muito próximos do pI da ampicilina (4,9), ou seja, do seu limite de menor solubilidade.

2.3.3 - RECRISTALIZAÇÃO

Apesar de na teoria cristais puros poderem ser obtidos a partir de soluções, algumas impurezas quase sempre permanecem no produto cristalino. Isto pode ocorrer por muitas razões. A impureza pode ter uma solubilidade similar àquela do produto desejado, e conseqüentemente, co-cristalizar parcialmente. Algumas vezes, a impureza está incorporada dentro da matriz do produto. Em outros casos, uma lavagem ineficiente não remove tudo do licor mãe e causa contaminação (Belter e colaboradores, 1988).

A recristalização pode freqüentemente reduzir a concentração da impureza. A sequência utilizada para realizar a recristalização por apresentar diferentes formas. No caso mais simples, os cristais de impureza são dissolvidos numa pequena quantidade de solvente puro aquecido e resfriados para produzir um grupo novo de cristais. Esses novos cristais serão mais puros do que os originais. Tal etapa pode ser repetida até que os cristais atinjam a pureza desejada (Belter e colaboradores, 1988).

Este tipo de operação, chamada de recristalização simples, é mostrada na Figura 2.9. Nesta figura, o solvente puro é designado por S , os licores mãe são denominados L_i , e os cristais originais são chamados AB . A pureza dos cristais aumenta a partir de X_1 , X_2 até X_3 ; a pureza dos licores também aumenta de L_1 , L_2 até L_3 (Belter e colaboradores, 1988).

Numa seqüência desse tipo, o rendimento do produto pode ser baixo e somente uma pequena porção do soluto desejado é recuperada nos cristais “puros” finais.

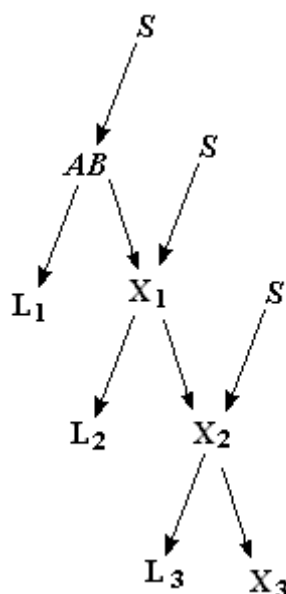


Figura 2.8 - RECRISTALIZAÇÃO SIMPLES. ESTE ESQUEMA, QUE UTILIZA SOLVENTE PURO PARA CADA RECRISTALIZAÇÃO, FORNECE ALTA PUREZA, PORÉM BAIXO RENDIMENTO (BELTER E COLABORADORES, 1988).

2.3.4 - PROCESSOS DE ADSORÇÃO

A adsorção é muito diferente da absorção, destilação e extração. Estes três processos envolvem tipicamente duas correntes fluindo em direções opostas. Na absorção, uma mistura de gás flui no sentido ascendente através de uma coluna empacotada enquanto uma corrente líquida absorvente desce. Na destilação, uma mistura líquida é dividida em um líquido destilado mais volátil e uma corrente de fundo menos volátil. Na extração, duas correntes se movem em sentidos opostos para gerar um extrato e um refinado. Sem dúvida, em alguns casos, o contato pode envolver estados de quase-equilíbrio, e em outros pode ser descrito com idéias de não-equilíbrio com coeficientes de transferência de massa. Ainda assim, todas as três operações unitárias envolvem dois fluidos em regime permanente (Cussler, 1997).

Em contraste, a adsorção é quase sempre um processo descontínuo envolvendo um fluido e um sólido. O uso de um sólido é a principal diferença. Por outro lado, os sólidos conseguem adsorver até meros traços de soluto, fazendo este método especialmente útil para soluções diluídas, incluindo aquelas correntes que requerem tratamento para controle de poluição. Os sólidos são difíceis de mover, causam abrasão em tubos e bombas durante a sua passagem e podem se quebrar em partículas finas que são difíceis de serem retidosreter. Desta maneira, geralmente a alimentação é bombeada através de um leito estacionário de partículas sólidas para efetuar uma separação por adsorção (Cussler,1997).

Logo, a adsorção requer um tipo diferente de pergunta daquelas exigidas na absorção ou destilação. Na absorção, a questão básica é que altura de torre é necessária. Essa pergunta é respondida com uma análise de transferência de massa, incluindo uma linha de operação e uma de equilíbrio. A análise de transferência de massa inclui coeficientes globais e individuais resumidos por correlações adimensionais. Na destilação, a questão básica é quantos estágios são necessários. Essa questão é resolvida com linhas de operação e equilíbrio, com aspectos de transferência de massa convenientemente englobados dentro de uma eficiência de Murphree. Em ambos, absorção e destilação, a análise é suficientemente confiável para responder às questões sem experimento (Cussler,1997).

Na adsorção, a análise matemática disponível é menos confiável, por isso ela é raramente feita sem o apoio de experimentos. O experimento inicial, feito em pequena escala, direciona à questão básica da adsorção: Como se comportará um leito em grande escala? Responder a esta questão comumente presume um conhecimento dos adsorventes e suas isotermas. A relação entre a quantidade adsorvida sobre um sólido e a concentração no fluido é chamada uma isoterma (Cussler,1997).

A maneira pela qual um adsorvente entra em contato com a solução, contendo o soluto a ser adsorvido, é particularmente importante para operações de separação em grande escala. As taxas de adsorção sobre os adsorventes são controladas pelos processos de transporte do soluto até a superfície e dentro dos adsorventes.

2.3.4.1 - SISTEMAS EM MISTURA

Os ensaios em batelada são convenientes e informativos para selecionar o tipo de adsorvente ou para otimizar certas condições. Nos experimentos em batelada, os parâmetros a serem examinados incluem a relação massa de adsorvente/ volume de solução, pH, temperatura e tempo de contato. Se o composto de interesse tem um ou mais grupos ionizáveis, o pH pode influenciar na capacidade de adsorção do sólido adsorvente. Desta maneira para adsorção em resinas hidrofóbicas, o pH deveria ser ajustado de tal forma que o composto de interesse não esteja ionizado (no seu ponto isoelétrico). É desejável empregar resinas com o menor diâmetro possível, operando em condições eficientes, para permitir que se alcancem altas taxas de adsorção. Poderosos adsorventes, por exemplo, são geralmente utilizados em reatores em batelada ou de mistura, ambos mostrados na Figura 2.10. No reator em batelada (a), solução e adsorvente são introduzidos no reator em uma única batelada, e após um tempo de contato determinado, são retirados da mesma forma. No reator de mistura contínua (b), solução e adsorvente são introduzidos e retirados continuamente. Para uma operação em regime permanente a vazão mássica de adição de soluto é igual a sua taxa mássica de adsorção no reator, Slejko, 1985.

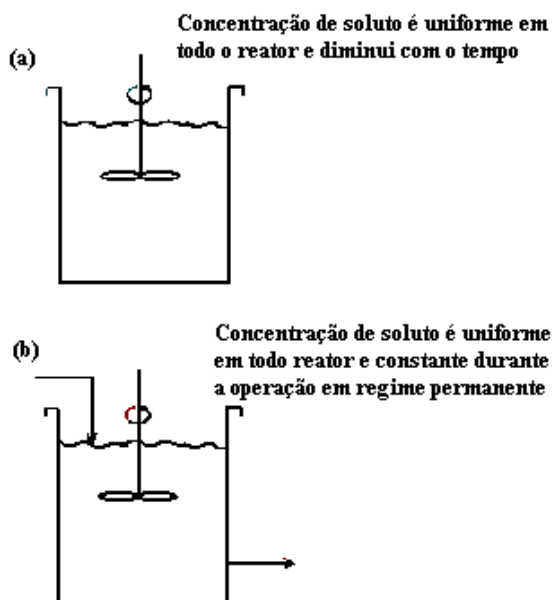


Figura 2.9 - (A) REATOR BATELADA . (B) REATOR DE MISTURA CONTÍNUA. (SLEJKO, 1985).

2.3.4.2 - SISTEMAS EM LEITO FIXO

Após a seleção de um ou mais adsorventes por meio dos ensaios em batelada, passa-se para a avaliação desses adsorventes em coluna. Neste estágio, além da avaliação dos adsorventes em módulo de coluna, deve-se verificar alguns pontos de interesse:

- (a) efeito do tipo de eluente na recuperação;
- (b) efeito do tipo de eluente no perfil de eluição;
- (c) efeito da carga sobre a recuperação;
- (d) efeito do fluxo na adsorção e eluição.

Quando o composto de interesse não é ionizável, um solvente orgânico como álcoois de peso molecular pequeno são usados como eluentes. Porém, um tampão ou uma mistura solvente/tampão pode ser utilizado para compostos ionizáveis (Verral, 1996).

Nas operações em coluna o adsorvente na entrada do leito está continuamente em contato com a corrente concentrada de afluente. A concentração no fluido em contato com uma dada camada de adsorvente varia muito lentamente sob estas condições, e uma alta relação de soluto por adsorvente é encontrada. Para o tratamento em batelada, geralmente a concentração de soluto em contato com toda a quantidade de adsorvente diminui continuamente enquanto ocorre a adsorção, por esse motivo diminui a eficiência do adsorvente para remoção do soluto (Verral, 1996).

Existem dois modos básicos para operação de um leito ou coluna adsorvente relacionado com a exaustão e regeneração da capacidade adsorvente; leitos fixos e “pulsados”. Nos chamados leitos fixos, o leito inteiro é removido da operação quando o adsorvente deste necessita ser reativado. No leito “pulsado”, somente a maior parte deste, que está exausta, é removida, enquanto um incremento de adsorvente novo é adicionado simultaneamente. Para concentrações relativamente baixas de soluto, aquelas típicas encontradas em águas de abastecimento e esgotos, por exemplo, o aumento da eficiência de uma operação em leito pulsado geralmente não compensa o custo adicional do equipamento; porém, para sistemas de altas concentrações típicos de alguns efluentes industriais, os leitos pulsados são freqüentemente efetivos e eficientes. Sistemas de múltiplos estágios operando em série constituem intermediários entre os sistemas de estágio único de leito fixo e pulsado (Slejko, 1985).

Um processo típico de adsorção em coluna segue o esquema apresentado na Figura 2.10.

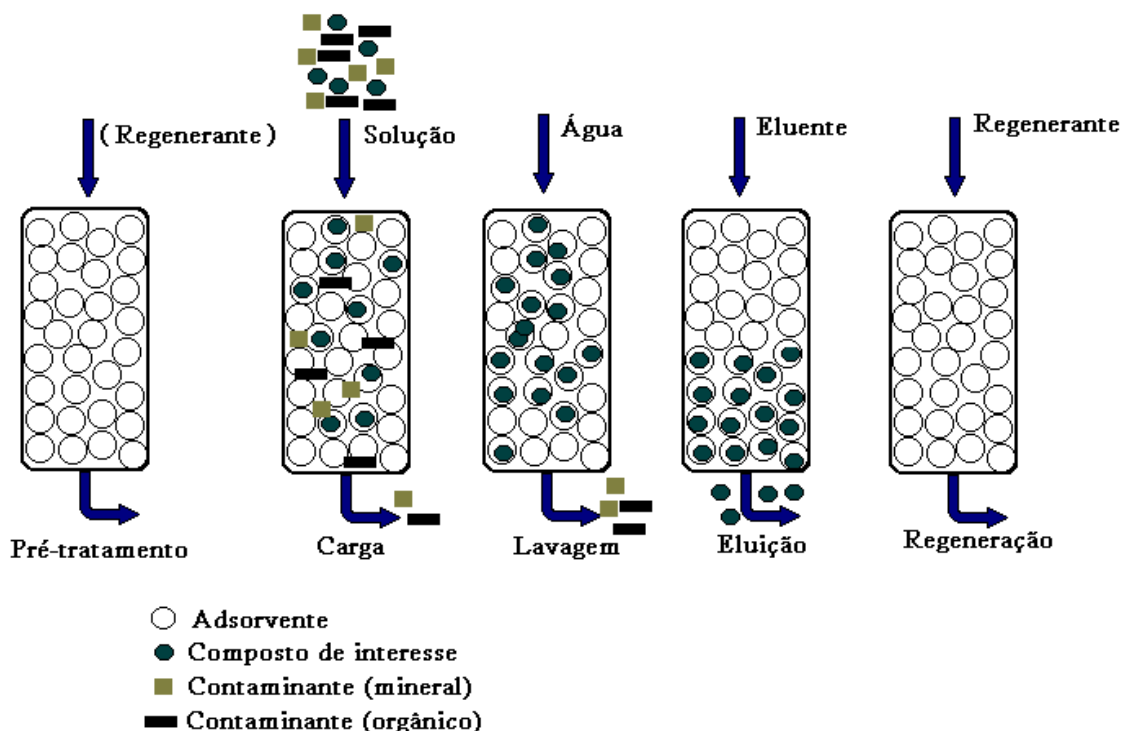


Figura 2.10 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DAS ETAPAS QUE COMPÕE UM PROCESSO DE ADSORÇÃO (VERRAL, 1996)

Os leitos adsorventes fixos podem ser designados para operar tanto com fluxo na direção ascendente (upflow) como descendente (downflow). Um modo descendente deve ser usado quando o adsorvente tem a capacidade de realizar ambas funções de adsorção e filtração. Embora menores custos possam ser encontrados pela eliminação de filtros de pré-tratamento, mais eficientes e freqüentes retro-lavagens do adsorvente são necessárias. Se o adsorvente não é requerido para a função de filtro, ele pode operar no modo de fluxo ascendente para minimizar a queda de pressão, formação de canais preferenciais, e “fouling” do adsorvente. Além disso, o projeto e operação em fluxo ascendente permitem tamanhos de partículas menores de adsorvente a serem utilizados para aumentar a taxa de adsorção e diminuir o tamanho do leito adsorvente (Slejko,1985).

Quando uma solução é passada através de um adsorvente estacionário, tanto em fluxo ascendente como descendente, as condições descontínuas prevalecem em que, o adsorvente continua adsorvendo soluto constantemente durante todo o período útil de operação. A Figura

2.11 é um gráfico padrão de uma adsorção idealizada ou curva de ruptura (breakthrough curve) para um adsorvente em condições descontínuas. O ponto inicial de ruptura (breakpoint) que está sobre esta curva, é o ponto no qual o efluente do leito ou coluna começa a ter sua concentração aumentada bruscamente, ordenando a substituição ou regeneração do adsorvente (Slejko,1985).

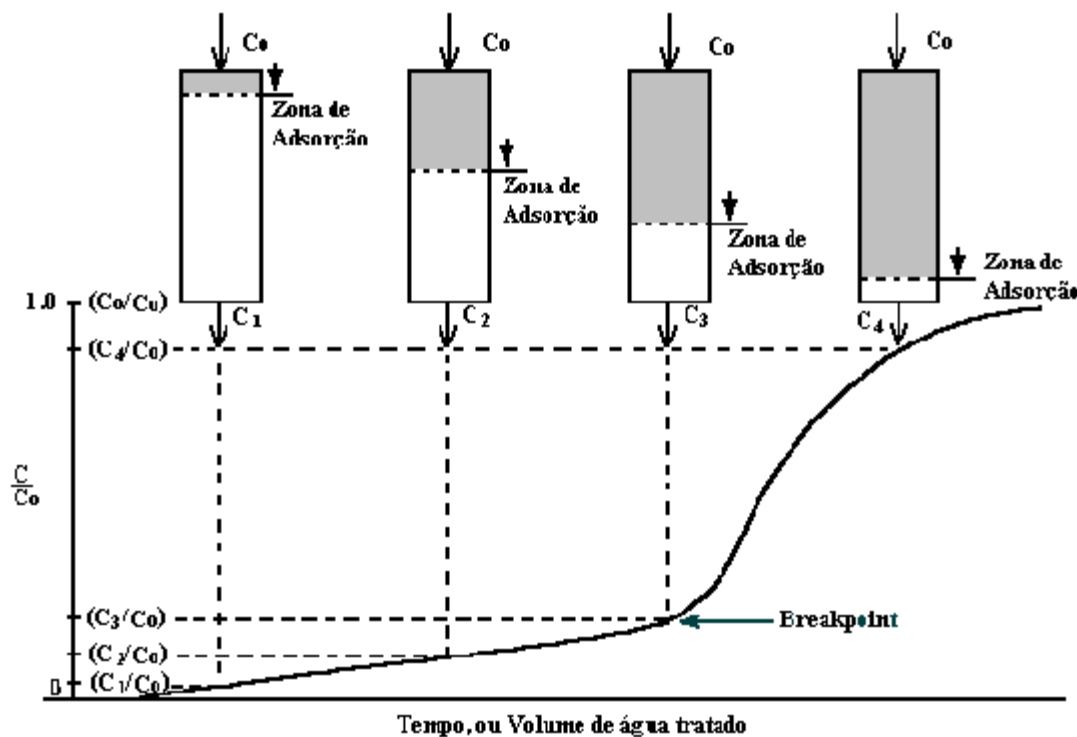


Figura 2.11 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DE UMA CURVA DE RUPTURA PARA UM LEITO FIXO ADSORVENTE (SLEJKO,1985)

Os fatores que afetam a forma geral da curva de ruptura incluem a concentração do soluto a ser adsorvido, pH, mecanismo da taxa limitante para adsorção, natureza das condições de equilíbrio, tamanho das partículas do adsorvente, altura da coluna ou leito, e velocidade do fluxo. Em geral, o tempo relacionado ao ponto inicial de saturação para um tipo específico de adsorvente e para um dado soluto é diminuído pelo: aumento do tamanho das partículas de adsorvente, aumento da concentração de soluto em solução, aumento da vazão e diminuição da altura do leito (Cussler, 1997).

2.3.4.3 - LEITOS EMPACOTADOS VERSUS TANQUES AGITADOS

A adsorção de um soluto a partir de um fluido para dentro de um sólido é muito mais eficiente num leito empacotado do que num tanque agitado. Pode-se especular que o leito empacotado é de certa maneira equivalente ao fluxo contra-corrente na extração ou absorção. Ou que um leito empacotado é mais como um reator plug-flow, capaz de alcançar uma conversão maior do que qualquer tanque agitado análogo. Outra possível explicação seria que um leito empacotado é mais compacto, e que isto permite uma transferência de massa mais rápida. Mesmo estando corretas todas estas “explicações”, elas não são as únicas razões do porque os leitos funcionam tão melhores para adsorção (Cussler, 1997).

Para entender porque os leitos funcionam bem, deve-se imaginar um grande volume de solução de alimentação através de um pequeno leito de um sólido fortemente adsorvente. O sólido está uniformemente empacotado, por isso o fluxo é como um pistão, movendo-se igualmente e sem dispersão, independente do raio do leito. Assumindo que o fluxo no leito é baixo, a adsorção é quase completa, aproximando-se de seu limite de equilíbrio (Cussler, 1997).

Sob estas condições, os perfis de concentração do soluto no fluido e no sólido são aqueles mostrados na Figura 2.12. A concentração do soluto na fase sólida é inicialmente zero. A solução de alimentação é adicionada a partir da esquerda do leito empacotado, resultando em abruptos perfis de concentração que se movem através do leito. Deve-se notar que a concentração do sólido está igual a zero ou em equilíbrio com a alta concentração de alimentação. Quando o leito está saturado, ou “carregado” tudo está em equilíbrio com a concentração de alimentação (Cussler, 1997).

No tanque agitado, a situação é muito diferente, como mostra a Figura 2.13 . Aqui, ambos sólido e solução são agitados juntos. Para tempos muito pequenos, a concentração na solução é mais alta do que no sólido. Após um tempo, a transferência de massa aumenta a concentração no sólido e diminui na solução. Para tempos longos, o sólido alcança um equilíbrio, mas com a solução contendo menos soluto. Esta concentração de equilíbrio é muito menor que aquela com a solução de alimentação. Logo, o tanque agitado apresenta um rendimento de separação muito menos efetivo que o leito empacotado (Cussler, 1997).

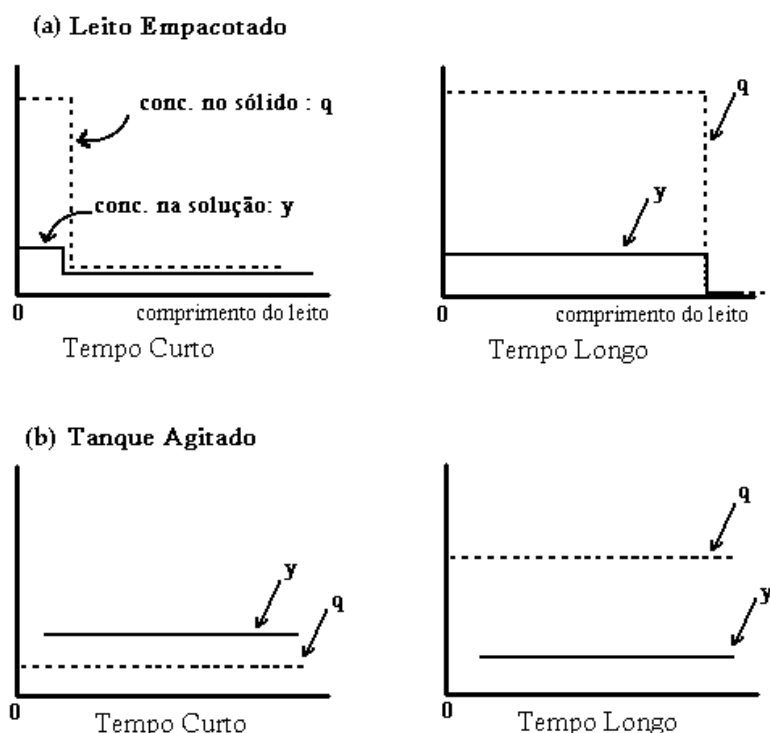


Figura 2.12 - CONCENTRAÇÕES NUM LEITO EMPACOTADO CONTRA AQUELAS ENCONTRADAS NUM TANQUE AGITADO (CUSSLER, 1997)

2.3.4.4 - TEMPO EM FUNÇÃO VOLUME DE LEITO

Pode-se facilmente por em gráfico as curvas de ruptura contra o tempo, pois esta é a maneira na qual os dados são comumente obtidos. Porém, pode-se algumas vezes ganhar mais percepção do comportamento destes leitos fazendo gráficos das curvas de ruptura contra o volume de eluente ou número de volumes de leito eluídos (Cussler, 1997).

Um gráfico da curva de ruptura contra o volume eluído nos ajuda a comparar diferentes adsorventes. Para um soluto não adsorvível, espera-se a saturação quando o volume eluído seja igual ao volume de vazios no leito empacotado. Para um soluto fortemente adsorvido, esperamos a saturação quando o volume eluído for muito maior que o volume de vazios do leito. Como resultado, muitas pessoas não constroem seus gráficos com seus dados em função do tempo, mas em função do número de volumes de leito, isto é, o volume de eluente dividido pelo volume de vazios do leito (Cussler, 1997).

2.3.4.5 - EFICIÊNCIA DO LEITO

Outro importante parâmetro que pode ser determinado a partir da curva de ruptura é a eficiência do leito de adsorção em função do comprimento de leito não usado. A Figura 2.14 representa uma curva teórica de ruptura. Para analisar este parâmetro deve-se possuir previamente a curva de ruptura determinada experimentalmente, como a apresentada abaixo:

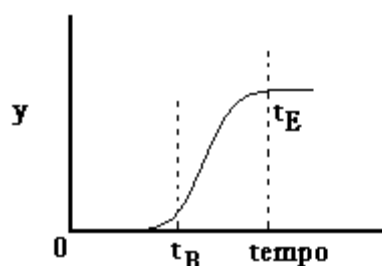


Figura 2.13 - CURVA DE RUPTURA TÍPICA PARA ADSORÇÃO EM LEITO EMPACOTADO: CONCENTRAÇÃO DE SOLUTO (Y) NA CORRENTE DE SAÍDA EM FUNÇÃO DO TEMPO (CUSSLER, 1997)

Agora é preciso estimar a quantidade necessária para um experimento muito maior. Um caminho fácil, sugerido pelos fabricantes de adsorventes, é assumir que a curva de saturação é uma rampa. A rampa é caracterizada por dois tempos. O primeiro, t_B , ocorre quando a concentração aumenta significativamente acima de zero. O segundo, o tempo de exaustão t_E , é quando o leito está essencialmente saturado. Quando se analisa este sistema, nota-se que a escolha dos tempos de t_B e t_E necessita de um julgamento para definir onde se situam cada deles, (Cussler,1997).

Assumir que a curva de saturação é uma rampa implica as seguintes considerações:

$$t \leq t_B \quad y = 0$$

$$t_B < t \leq t_E \quad y = y_0 \left((t - t_B) / (t_E - t_B) \right)$$

$$t > t_E \quad y = y_0$$

Quando $t = t_B$, isto sugere que o perfil de concentração dentro do leito de comprimento ℓ é:

$$z \leq \ell_{\text{sat}} \quad y = y_0$$

$$\ell_{\text{sat}} < z \leq \ell \quad y = y_0 (\ell - z / \ell - \ell_{\text{sat}})$$

$$z > \ell \quad y = 0$$

$$\text{onde } \ell_{\text{sat}} = [y_0 v / q_0 (1 - \varepsilon)] (t_E - t_B)$$

e y_0 e q_0 são as concentrações de alimentação e saturada no adsorvente, respectivamente, e ε é a fração de vazios no leito. Assim, um perfil de concentração implica a fração do leito que está carregado ou a eficiência do leito (θ) é:

$$\theta = 1 - ((t_E - t_B) / 2 t_B)$$

Alternativamente, pode-se definir o comprimento do leito não utilizado ℓ' como

$$\ell' = \ell (1 - \theta)$$

Por exemplo, se o leito é exaurido num tempo t_E igual a $1,4 t_B$, então o leito está cerca de 80% saturado. Se a curva de saturação realmente é uma função degrau, então t_E é igual a t_B e o comprimento do leito não usado é igual a zero.

A chave para o sucesso desta aproximação está no fato de que perfil de concentração dentro do leito tende a se desenvolver rápido e, mantendo a sua forma, mover-se através do leito. Isto funciona assim devido à natureza da maioria das isotermas. A grande maioria das isotermas é favorável, ou seja, adsorvem mais fortemente em soluções diluídas do que em concentradas. Logo, qualquer soluto que fique a frente do perfil é adsorvido e assim retardado, e qualquer soluto que fique atrás tende a fluir para frente mais rápido (Cussler, 1997).

2.3.4.6 - ADSORVENTES COMUNS

Enquanto um grande número de adsorventes é usado industrialmente, apenas dois grupos principais são usados para moléculas biológicas: carvão e resinas sintéticas. Os carvões usados são produtos comerciais e não são fabricados especialmente para bioseparações. Uma grande variedade de produtos está disponível, com porosidade e capacidade variáveis. As mais efetivas são feitas a partir de fontes vegetais como serragem e

caroços de frutas; os carvões feitos a partir de fontes minerais podem conter impurezas inorgânicas que catalisam a degradação de alguns solutos (Verral, 1996).

As resinas de troca-iônica são principalmente baseadas em polímeros sintéticos. Os polímeros possuem geralmente cargas fixadas como $-\text{SO}_3^-$, $-\text{COO}^-$, ou $-\text{NH}_3^+$; porém, eles podem efetivamente adsorver solutos iônicos e não iônicos. Resinas feitas a partir de estireno ou divinilbenzeno freqüentemente adsorvem solutos não polares mais fortemente; resinas baseadas em ésteres acrílicos tendem a ser mais efetivas para solutos hidrofílicos. Os adsorventes baseados em hidrogéis são geralmente feitos de poliacrilamidas, que são o suporte principal da eletroforese em gel (Verral, 1996).

Os adsorventes sintéticos são materiais orgânicos poliméricos com características hidrofóbicas de adsorção as quais podem ser aproveitadas em processos de separação biológica. Estes adsorventes sintéticos são agora largamente usados no campo da biotecnologia e no isolamento de produtos naturais desde pesquisa em escala laboratorial até produção industrial (Verral, 1996).

Os adsorventes sintéticos são materiais esféricos e altamente porosos com uma superfície hidrofóbica, o que permite a adsorção de compostos orgânicos hidrofóbicos sobre sua superfície. Por esta função seletiva, eles podem ser usados para extração de compostos orgânicos de soluções aquosas tais como caldos de fermentação (a solução aquosa a ser tratada com um adsorvente sintético é freqüentemente referida como licor). Considerando a transferência de massa dos compostos desejados, a função dos adsorventes sintéticos é similar àquela da extração com solventes. Porém, o uso dos adsorventes sintéticos tem muitas vantagens sobre os processos convencionais de extração com solventes (Verral, 1996).

Uma diferença é que os processos adsorventes requerem uma quantidade muito menor de solventes orgânicos. Estes são freqüentemente tóxicos e inflamáveis, logo sua eliminação pode ter vantagens práticas. Outra diferença é que os adsorventes têm uma função de peneira molecular baseada na sua estrutura porosa de tal forma que o fracionamento pelo tamanho molecular pode ocorrer durante o processo. Além disso, os adsorventes podem ser usados retidos dentro de coluna ou num modo em batelada (em suspensão). Quando uma grande quantidade de solução tem de ser tratada e a concentração dos compostos desejados é muito baixa, um processo com coluna adsorvente pode ser muito eficaz (Verral, 1996).

Diferente de outros tipos de adsorventes tais como carbono ativado e zeólita (sólidos inorgânicos), os adsorventes sintéticos apresentam uma adsorvidade relativamente suave permitindo que os compostos adsorvidos possam ser eluídos sob condições mais brandas. Isto também significa que os adsorventes podem ser usados repetidamente. Na prática, estas características devem ser levadas em consideração como vantagens econômicas importantes na escolha de um processo de purificação (Verral, 1996).

2.3.4.7 - ISOTERMAS DE ADSORÇÃO

A adsorção de uma substância a partir de uma fase para a superfície de outra num sistema específico conduz a uma distribuição desta substância entre as fases, quando o sistema alcança o equilíbrio definido termodinamicamente (Slejko, 1985).

Como na extração, a análise da adsorção está baseada no equilíbrio e nos balanços de massa. A diferença básica é que o equilíbrio não é apresentado como coeficiente de partição, mas sim como uma isoterma de adsorção. Isotermas típicas de adsorção são mostradas na Figura 2.14 (Cussel, 1997).

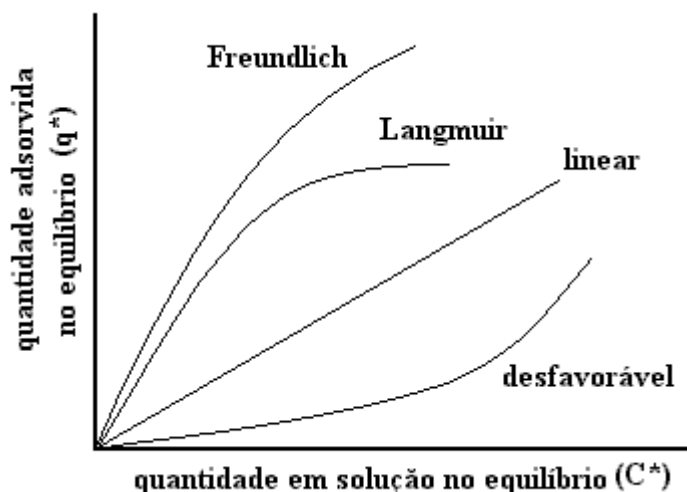


Figura 2.14 - ISOTERMAS COMUNS DE ADSORÇÃO. TODAS ISOTERMAS PODEM SE APROXIMAR DE UMA LINEAR PARA SOLUÇÕES ALTAMENTE DILUÍDAS (CUSSEL, 1997).

Para cada isoterma, a abscissa corresponde a concentração de soluto em solução, geralmente expressa em massa de soluto por volume de solução. A ordenada corresponde a

concentração de soluto sobre a superfície adsorvente, freqüentemente expressa em massa de soluto por massa de adsorvente. Qualquer isoterma adsorvente que seja côncava com respeito a abscissa é dita ser “favorável”, para adsorções fortes ocorre mesmo em soluções diluídas. Qualquer isoterma côncava em relação à ordenada é descrita com “desfavorável” (Cussel, 1997).

2.3.4.7.1 - ISOTERMA LINEAR

O modelo de isoterma mais simples é o da adsorção linear ou partição constante que é descrito por uma equação da forma:

$$q^* = KC^* \quad (2.1)$$

onde q^* é a quantidade de soluto adsorvido por quantidade de adsorvente, C^* é a concentração de soluto em solução, e K é a constante de equilíbrio. Como a constante de partição usada na extração, K é uma quantidade termodinâmica; mas ao contrário do coeficiente de partição, K pode ter dimensões, freqüentemente de volume de solução por massa de adsorvente. Enquanto que a isoterma linear não é comum, esta pode se aproximar das outras isotermas durante uma limitada faixa de concentração (Slejko, 1985).

2.3.4.7.2 - ISOTERMA DE FREUDLICH

A isoterma empírica de Freundlich descreve a adsorção de uma grande variedade de antibióticos, esteróides e hormônios. Esta é dada por

$$q^* = K_F C^{*n} \quad (2.2)$$

onde as constantes n e K_F devem ser determinadas experimentalmente. Estas constantes são determinadas melhor por meio de um gráfico log-log de q^* contra C^* . A inclinação deste gráfico é o expoente n adimensional. As dimensões de K_F dependem do valor de n . Se a adsorção é favorável, então $n < 1$; se esta é desfavorável, logo $n > 1$.

A isoterma de Freudlich corresponde a adsorção em sítios não uniformes. Nesse caso o calor de adsorção freqüentemente diminui com o aumento da cobertura na superfície. A falta

de uniformidade, no entanto, pode existir previamente nos diferentes sítios ou pode ser causada pelas forças repulsivas entre os átomos ou moléculas adsorvidas (Slejko, 1985).

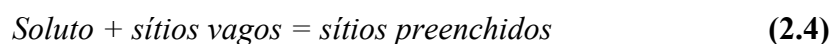
2.3.4.7.3 - ISOTERMA DE LANGMUIR

A isoterma de Langmuir que é uma das mais clássicas na literatura e que assume a formação de uma camada homogênea sobre a superfície de adsorção, sem que haja interações entre as moléculas adsorvidas. A representação matemática desta isoterma é dada por:

$$q^* = \frac{qm C^*}{K_L + C^*} \quad (2.3)$$

onde qm e K_L são novamente constantes que devem ser determinadas experimentalmente. Neste caso, o caminho mais fácil para fazer isto é graficar q^{*-1} contra C^{*1} . O ponto que intercepta o eixo das ordenadas é qm^{-1} e a inclinação da curva é K_L/qm .

Ao contrário da isoterma de Freundlich, a de Langmuir possui uma forte base teórica. Esta base está fundamentada num postulado de reação química entre o soluto e os sítios vagos sobre a superfície do adsorvente e a não existência de interação entre soluto-soluto, resultando num recobrimento em monocamada:



Se esta reação está no equilíbrio, logo é descrita pela constante de equilíbrio K_L

$$K_L = \frac{[\text{soluto}][\text{sítios vagos}]}{[\text{sítios preenchidos}]} \quad (2.5)$$

Além disso, o número total de sítios ativos deve ser fixado,

$$[\text{sítios totais}] = [\text{sítios vagos}] + [\text{sítios preenchidos}] \quad (2.6)$$

Combinando as duas últimas equações temos,

$$K_L = \frac{[\text{sítios totais}][\text{soluto}]}{K_L + [\text{soluto}]} \quad (2.7)$$

Assim, o número de sítios preenchidos é proporcional a q^* , a equação 2.7 é equivalente a equação 2.3. Logo o valor máximo de q_m reflete o número limitado de sítios ativos do adsorvente ou seja, reflete a capacidade máxima de adsorção sobre a superfície; K_L é a constante de equilíbrio; C^* é a concentração de soluto em solução que está em equilíbrio com a quantidade adsorvida q^* (Slejko, 1985).

2.3.4.8 - TAXAS DE ADSORÇÃO

Existem essencialmente três etapas de transportes de massa consecutivas associadas com a adsorção de solutos a partir de soluções em adsorventes porosos. Estes transportes estão ilustrados esquematicamente na Figura 2.15. A primeira etapa, transporte do soluto no bulk, é geralmente muito rápida devido à mistura e ao fluxo convectivo. A segunda etapa, transporte no filme, envolve a difusão do soluto através de um filme hipotético ou uma camada hidrodinâmica. Exceto para uma quantidade muito pequena de adsorção que ocorre no exterior do adsorvente, a grande parte do soluto deve difundir-se para dentro do poro do adsorvente e/ou ao longo da superfície da parede do poro para um sítio ativo de adsorção (transporte intrapartícula).

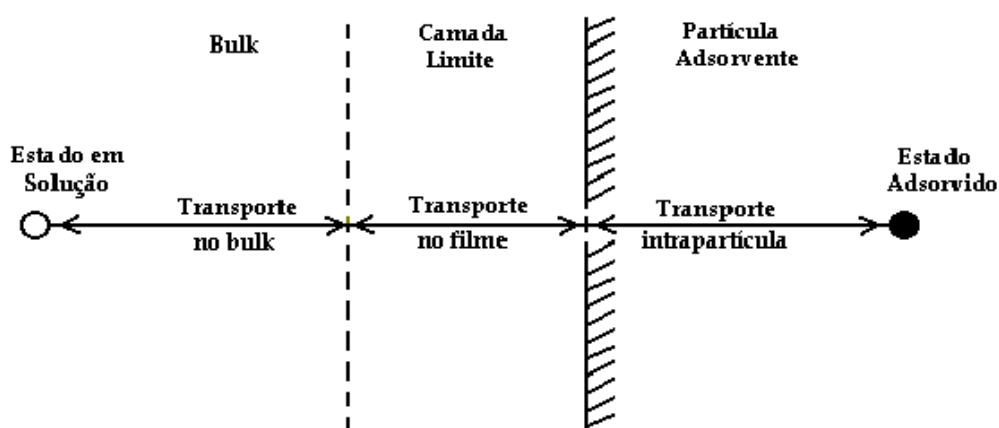


Figura 2.15 - ETAPAS DE TRANSPORTE DE MASSA NA ADSORÇÃO UTILIZANDO ADSORVENTES POROSOS (SLEJKO, 1985).

A adsorção real de um soluto dentro da superfície de um sítio é geralmente considerada como muito rápida, sendo equivalente a uma reação de equilíbrio, e desta maneira insignificante no contexto global da taxa de adsorção. Os transportes no filme e

intrapartícula são então os principais fatores que controlam as taxas de adsorção em adsorventes porosos. Como estes fatores atuam em série, o mais lento será a taxa limitante; se as etapas são comparáveis na taxa, o controle pode ser distribuído entre os mecanismos intrapartícula e externo (Slejko, 1985).

A difusão externa ou transporte no filme controla a transferência do soluto a partir do bulk da solução através da camada limite hidrodinâmica imediatamente adjacente a superfície externa da partícula adsorvente. O transporte no filme é governado pela difusão molecular e, no caso de fluxo turbulento é o que controla a espessura efetiva da camada limite e conseqüentemente a difusão. O método usado para por em contato um adsorvente com uma solução (por exemplo, operando em reator em batelada, reator de mistura ou plug flow), junto com a hidrodinâmica e detalhes operacionais de um sistema específico, controlam e definem a magnitude do coeficiente externo de transferência de massa (Slejko, 1985).

2.4 - CONFIGURAÇÕES PARA PRODUÇÃO ENZIMÁTICA DE ANTIBIÓTICOS β -LACTÂMICOS

Uma área específica onde existe uma necessidade de desenvolvimento de processos para separar um componente não dissolvido a partir de dois ou mais componentes não dissolvidos é a acilação enzimática ou catalítica de um núcleo β -lactâmico produzindo penicilinas ou cefalosporinas. As potenciais desvantagens dos métodos enzimáticos conhecidos para produção de antibióticos β -lactâmicos semi-sintéticos são as concentrações iniciais de 6-APA muito baixas (geralmente menores que 25mM), logo tornando o isolamento do antibiótico semi-sintético formado mais difícil e conseqüentemente mais caro. Além disso, os rendimentos relatados são baixos, tipicamente menores que 85%, e um processo para reciclagem dos núcleos β -lactâmicos não reagidos é requerido, o que conduz a mais unidades de operação e assim mais custos (Kaasgaard e colaboradores, 1993).

Em reações envolvendo um catalisador, o preço deste é freqüentemente um elemento importante no custo geral de produção e surge então a necessidade de projetar um processo na qual o catalisador possa ser reutilizado sem perdas significativas da sua atividade catalítica. O isolamento e reutilização do catalisador são impedidos quando este está presente numa mistura reacional contendo outro componente que pode estar presente durante o processo

inteiro ou ser formado durante a reação. Surge então a necessidade de separar o catalisador a partir da mistura reacional contendo, entre outros, produtos e substâncias não reagidas que podem estar presentes em diferentes formas, cristalina, amorfa e solúvel

Um dos problemas encontrados pelo aumento na concentração dos substratos na síntese enzimática dos β -lactâmicos semi-sintéticos é a baixa solubilidade de algumas das substâncias envolvidas e dos produtos formados durante a reação. Assim, para realizar o processo em condições economicamente favoráveis, um nível de concentração de substratos e produtos poderia estar acima de suas respectivas solubilidades, isto é, eles poderiam estar presentes durante toda ou parte da reação, ambos numa forma cristalina, amorfa ou outra forma sólida e numa forma solúvel, e a enzima usada deveria estar numa forma reutilizável, por exemplo, imobilizada. Assim como o produto requerido também tem uma baixa solubilidade, um complexo processo de separação é inevitável. Três sólidos (isto é, o antibiótico desejado, fenilglicina e a enzima imobilizada) necessitam ser separados a partir da mistura de reação (Kaasgaard e colaboradores, 1993).

Uma possível solução para separação do catalisador a partir da mistura reacional, que contém material sólido, é a preparação de um catalisador com uma densidade menor do que a do líquido. Este sistema foi proposto e utilizado por Kaasgaard e colaboradores, 1992, para síntese de ampicilina. A Figura 2.16 ilustra o sistema utilizado.

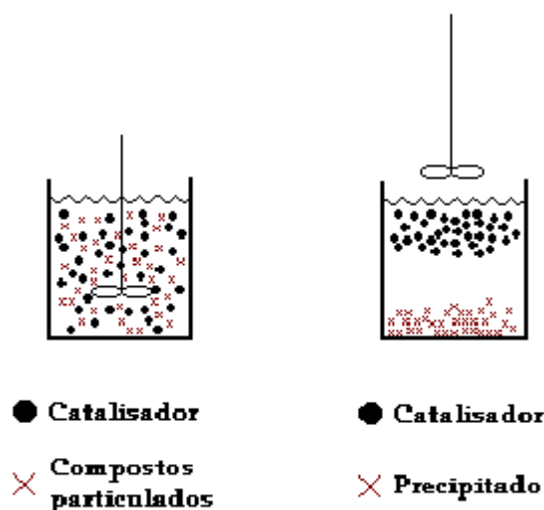


Figura 2.16 - SISTEMA UTILIZANDO CATALISADOR COM DENSIDADE MENOR QUE A DO LÍQUIDO UTILIZADO POR KAASGAARD E COLABORADORES, 1992.

Como alternativa, uma técnica de peneiramento pode ser aplicada como ilustrado na Figura 2.17. Quando uma enzima imobilizada sobre partículas suficientemente grandes é usada (isto é, diâmetro > 150 μm), o catalisador pode ser retido durante a drenagem do reator. Pelo projeto de uma peneira apropriadamente espaçada, o material cristalino pode ser transportado junto com o efluente (Bruggink e colaboradores, 1998).

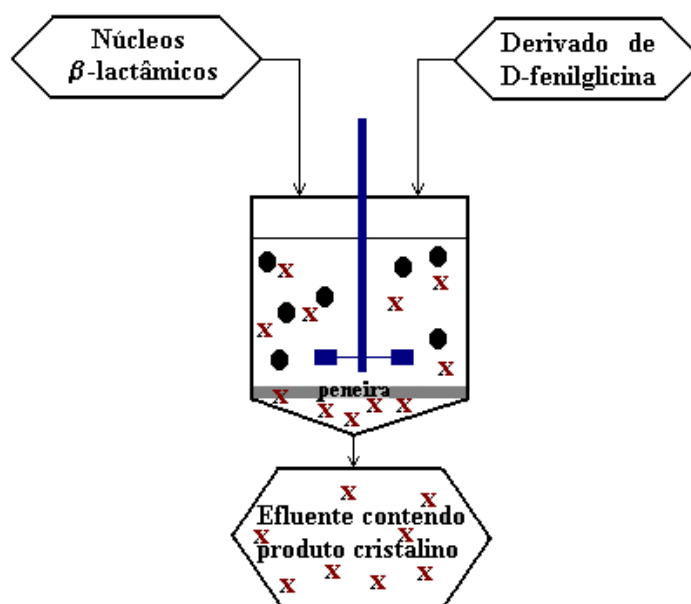


Figura 2.17 - FLUXOGRAMA GERAL DE RECUPERAÇÃO DE ANTIBIÓTICOS β -LACTÂMICOS

A síntese de ampicilina é dificultada pelo fato de que a solubilidade do produto é alta (comparada com a amoxicilina, por exemplo). Com isso, a percentagem de degradação pode atingir níveis inaceitáveis a não ser que cuidados especiais sejam tomados. Uma solução deve ser encontrada num projeto na qual todo o 6-APA presente seja convertido a produto, o qual, é rapidamente recuperado por meio de cristalização. Logo, num procedimento típico, a ampicilina é sintetizada a partir do 6-APA e excesso de fenilglicina amida ou éster metílico de fenilglicina durante o processo no qual ampicilina e fenilglicina na forma cristalina são formadas. O biocatalisador é removido por peneiramento e todos cristais são dissolvidos num pH alcalino. Após a concentração, a ampicilina pura pode ser obtida por cristalização no seu ponto isoelétrico. Num segundo estágio de concentração e cristalização, a fenilglicina pode ser obtida, representação esquemática do sistema está mostrada na Figura 2.18 (Bruggink e colaboradores, 1998).

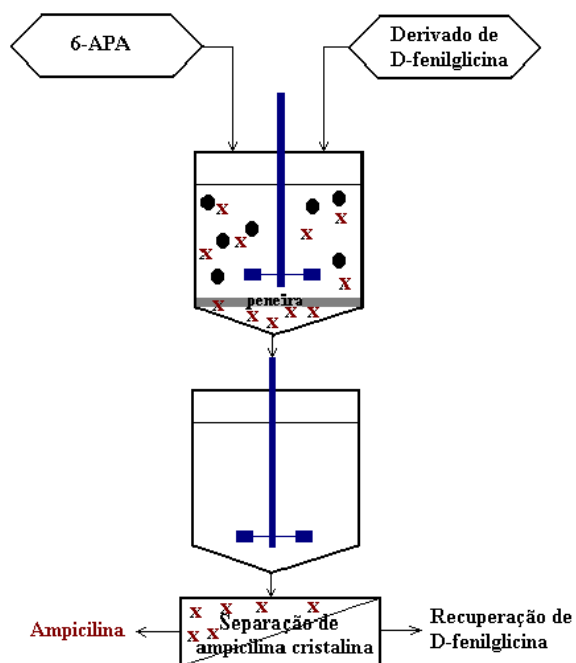


Figura 2.18 - FLUXOGRAMA PARA OBTENÇÃO DE AMPICILINA

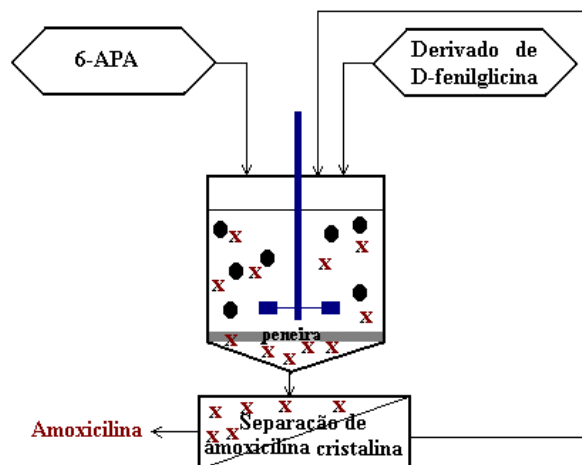


Figura 2.19 - FLUXOGRAMA PARA OBTENÇÃO DE AMOXICILINA

A Figura 2.19 mostra o fluxograma para obtenção de amoxicilina, obtida a partir de 6-APA e hidroxifenilglicina amida ou éster metílico de p-hidroxifenilglicina, pode ser considerada a vantagem da baixa solubilidade do produto nas condições de conversão. Devido a este fenômeno, a proporção de síntese/hidrólise é alta, pois em solução quase nenhuma amoxicilina está disponível para hidrólise. Além disso, pelo mesmo motivo, a degradação da amoxicilina é mínima. Como a amoxicilina é o 1º composto a precipitar, um sistema de reator semi-contínuo para a produção de amoxicilina a altas concentrações de substrato poderia ser desenvolvido com sucesso (Bruggink e colaboradores, 1998).

Clausen e Dekkers, 2000, propuseram um sistema para produção de β -lactâmicos operando em concentrações constantemente altas dos reagentes. Neste sistema tanto os reagentes como os produtos podem ser retirados continuamente ou semi-continuamente de maneira a manter suas concentrações em valores desejados. Um dos exemplos apresentados pelos autores foi a utilização deste sistema para a produção de Amoxicilina a partir de HPGM (éster metílico de p-hidroxifenilglicina) e 6-APA (ácido 6-aminopenicilânico).

A Figura 2.20 é uma representação esquemática do processo proposto pelos autores. O esquema é composto de um reator conectado a um sistema de autotitulação (ácido sulfúrico

4M), como titulante. Uma válvula posicionada na saída do reator e a saída da válvula conectada via bomba à uma centrífuga. A saída da centrífuga é conectada via bomba ao tanque de alimentação que é equipado com agitador e um vidro sinterizado no fundo. A saída do tanque de alimentação é conectada ao reator via bomba peristáltica. Os cristais de Amoxicilina e D-HPG (D-p-hidroxifeniglicina) são separados do licor mãe na centrífuga. O licor mãe, que estava sub-saturado com éster e 6-APA foi bombeado até o tanque de alimentação.

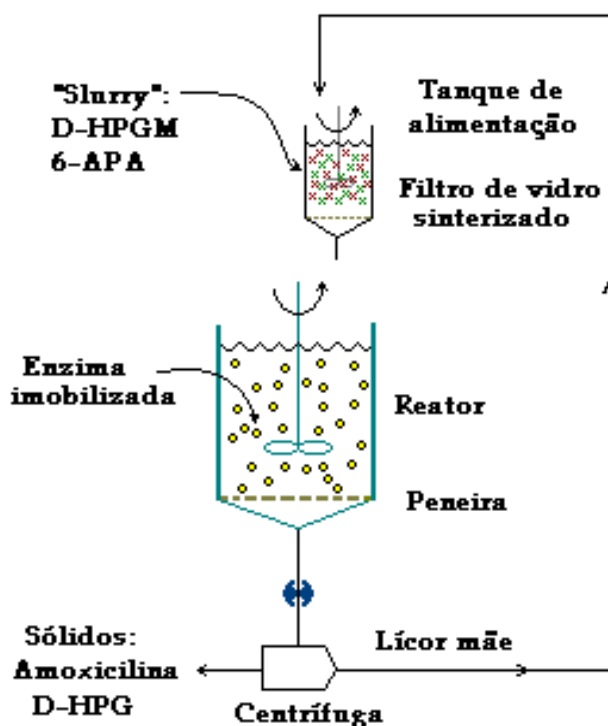


Figura 2.20 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA PRODUÇÃO DE AMOXICILINA PROPOSTA POR CLAUSEN E DEKKERS, 2000.

Em alguns casos o catalisador pode ser isolado por extração dos outros componentes sólidos pelo uso de solventes orgânicos e/ou com ácidos ou bases os quais dissolverão os sólidos exceto o catalisador. Contudo, a atividade do catalisador, incluindo enzimas, é muito sensível à presença dos chamados “venenos” catalíticos. Estes venenos exercem sua atividade ligando-se muito fortemente ao catalisador ou decompondo-o. Então, ácidos ou bases fortes freqüentemente têm um efeito adverso sobre a atividade do catalisador e em particular sobre as enzimas, causando danos irreversíveis quando estas são expostas a altas concentrações destes ácidos ou bases. Isto impõe certas limitações ao uso de ácidos e bases quando se

trabalha com misturas reacionais a partir de reações enzimáticas e deseja-se reciclar a enzima sem perdas significativas de atividade. Outras limitações podem ser impostas pela natureza do produto desejado o qual pode ser um composto sensível (Kaasgaard e colaboradores, 1993).

Comparando-se os sistemas de reatores apresentados por Kaasgaard e colaboradores, 1992, 1993 e 1996, Bruggink e colaboradores 1998, e Clausen e Dekkers, 2000, pode-se verificar que, apesar de algumas diferenças na forma de operar e nas condições iniciais da reação, o modelo do reator e a seqüência de etapas permanecem praticamente os mesmos. Isto nos permite concluir que, apesar de pequenas variações apresentadas na forma de operar os reatores, todos autores utilizam seqüências com características muito semelhantes e parece estar entre um destes modelos ou uma combinação deles, o mais adequado à produção enzimática de antibióticos β -lactâmicos semi-sintéticos.

Em tese, a adsorção hidrofóbica poderia ser utilizada em diferentes etapas do processo de síntese enzimática de ampicilina e com distintos objetivos. Dependendo da eficiência obtida, da necessidade do processo e obviamente, de sua viabilidade econômica, a adsorção poderia ser usada como um processo de separação e/ou concentração. Por exemplo, poderia utilizar-se a adsorção para separar a ampicilina a partir da mistura de ampicilina e fenilglicina obtida após a precipitação do antibiótico no seu ponto isoelétrico, ou seja, após a precipitação da ampicilina, uma mistura de ampicilina e fenilglicina em solução é obtida, esta solução poderia ser passada por uma coluna de adsorção hidrofóbica para separar os compostos.

Partindo-se do mesmo exemplo citado acima, talvez não haja interesse em separar os compostos a partir solução. Pode ser que seja mais interessante retornar os compostos ao reator de forma a partir-se com uma concentração no limite de solubilidade de ampicilina, de maneira que toda ampicilina formada comece a precipitar no início da reação, pois já estará no seu limite de solubilidade. Neste caso, pode-se utilizar a adsorção para concentrar os compostos a partir da solução e após sua concentração, retorná-los ao reator para reiniciar outra batelada de reação.

Como pode ser observada nos exemplos citados, a utilização da adsorção não se restringe a uma aplicação específica, mas sim de vários modos e pontos de aplicação que dependem diretamente da configuração final do sistema utilizado para produção de ampicilina bem como dos objetivos que se deseja usando a o processo de adsorção.

3. Materiais e Métodos

3.1 - MATERIAIS

- **Adsorventes Poliméricos:** os adsorventes poliméricos Amberlite XAD-4 (poliestireno divinilbenzeno), Amberlite XAD-7 (éster alifático) e Duolite XAD-761(fenol-formaldeído) foram obtidos da Rohm & Haas Co. (Brasil).
- **Substratos:** Éster metílico de fenilglicina, Ácido 6-aminopenicilânico (6-APA) ampicilina trihidratada e fencilglicina doadas pelo Laboratório Basf.
- **Reagentes HPLC:** Todos os reagentes utilizados no preparo das fases móveis eram grau HPLC de diferentes fontes comerciais.
- Todos os outros reagentes usados eram grau analítico de diferentes fontes comerciais.

3.2 - EQUIPAMENTOS

- Balança de precisão marca KERN modelo 410
- pHmetro marca Orion modelo 420A
- Espectrofotômetro marca PHARMACIA BIOTECH modelo Ultrospec 2000
- valores de pHtato marca METROHM modelo 718 STAT Titrimo
- Reator de vidro com camisa de água
- Agitador mecânico
- Cromatógrafo líquido de alta pressão (HPLC) marca Waters
- Cromatógrafo líquido de alta pressão (HPLC) marca Shimadzu
- Coluna para HPLC Nova-Pak, C18, 60Å, 4µm, 3.9x150mm da Waters
- Coluna para HPLC C18 Analisis Vinicus, 5µm

3.3 - MÉTODOS

3.3.1 - DETERMINAÇÃO DAS SOLUBILIDADES DOS COMPOSTOS

As solubilidades do EMFG, AMPI, 6-APA e FG foram determinadas seguindo o método de GUDE et al., 1996. Os ensaios foram realizados a temperatura constante, 25°C. As amostras foram preparadas gravimetricamente, e colocadas em frascos de 80 mL com tampa rosqueável. Os frascos então eram imersos num banho termostaticado, sob agitação suave. Todas as amostras foram agitadas por pelo menos 4 horas e em seguida as suspensões foram deixadas para sedimentar. Após a sedimentação, amostras do sobrenadante foram retiradas por meio de uma seringa acoplada a um filtro de 0,2µm, evitando assim a passagem de sólidos. Após esta etapa, as amostras eram diluídas e analisadas em HPLC.

3.3.2 - DETERMINAÇÃO DAS CONSTANTES DE DISSOCIAÇÃO

Os testes para determinação das constantes de dissociação dos compostos seguiram a seguinte metodologia:

Soluções de (5 -10 mM) de cada composto foram dissolvidas em água ou mistura água/metanol (% em peso de metanol): 0, 15, 30, 50. Os valores de pK foram determinados a 25°C por titulação automática em valores de pH_{ato}, utilizando como titulante 0,1N NaOH ou 0,1N HCl. Todos os resultados foram obtidos a partir de um valor médio de três ensaios.

3.3.3 - ENSAIOS DE ADSORÇÃO EM BATELADA

3.3.3.1 - DETERMINAÇÃO DO TEMPO DE EQUILÍBRIO

Antes de utilizados, os adsorventes foram inicialmente tratados com metanol e em seguida lavados extensivamente com água destilada. O adsorvente livre de composto orgânico foi seco em estufa a 30°C por 24 horas. Para os experimentos em batelada, a resina foi pesada, 0,25g (em base seca), hidratada com etanol e posteriormente lavada com grande quantidade de água para retirada total do etanol.

Os experimentos para determinação do tempo necessário para atingir o equilíbrio foram realizados em batelada. Foi utilizado 0,25g (em base seca) de adsorvente (mr) para 5mL de solução (Vs) com concentração inicial conhecida ($C_0=5\text{mM}$) dos compostos analisados. Os frascos foram lacrados com rolhas de borracha e deixados sob agitação suave em mesa rotativa com temperatura controlada de 25°C . Amostras eram retiradas em intervalos de tempo para verificação da concentração da espécie em solução, no momento em que não ocorreu mais variação na concentração em solução o equilíbrio fora alcançado. A concentração de soluto na amostra foi determinada por espectrofotometria de UV, medindo-se a absorbância no comprimento de onda de 240nm, utilizando-se cubeta de quartzo de 1cm de caminho ótico.

3.3.3.2 - DETERMINAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE ADSORÇÃO

Os experimentos para determinação da eficiência de adsorção foram realizados em batelada. Foi utilizado 0,25g (em base seca) de adsorvente (mr) para 5mL de solução (Vs) com concentração inicial conhecida ($C_0=5\text{mM}$) dos compostos analisados. Os frascos foram lacrados com rolhas de borracha e deixados sob agitação suave em mesa rotativa com temperatura controlada de 4°C e 25°C , por um tempo de contato ($t_c= 24\text{h}$ e 2h , respectivamente), para garantir que o equilíbrio fosse alcançado.

Os experimentos em batelada foram realizados em diferentes valores de pH de solução (4,5, 5,5, 6,5, 7,5 e 8.5), sem a utilização de meio tamponante, ou seja, os valores de pH foram acertados apenas no início de cada experimento. No final da adsorção uma amostra da solução foi coletada a partir de cada tubo, utilizando-se filtros de $0,45\mu\text{m}$ para evitar a passagem de sólidos. A concentração de soluto na amostra foi determinada por espectrofotometria de UV, medindo-se a absorbância no comprimento de onda de 240nm, utilizando-se cubeta de quartzo de 1cm de caminho ótico. A eficiência de adsorção foi calculada por meio da relação percentual entre a concentração inicial (C_0) e a final determinada após as 2h de adsorção. A Figura 3.1 é uma representação esquemática da sequência utilizada nos experimentos em batelada.

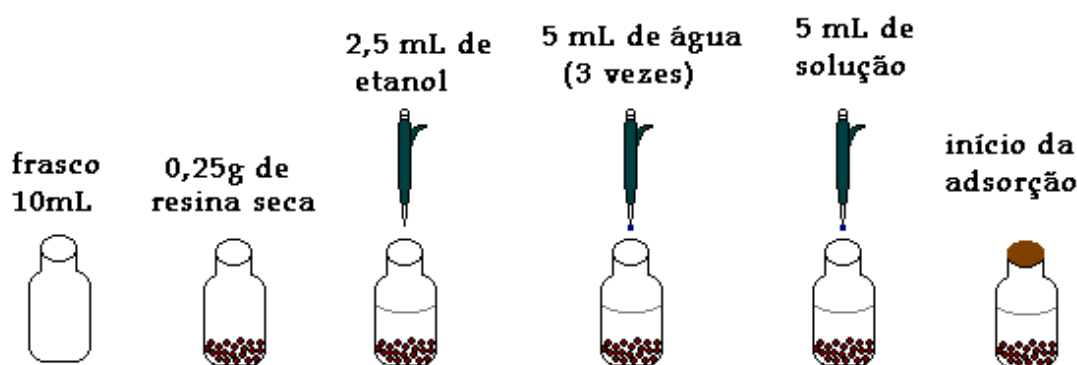


Figura 3.1 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA SEQUÊNCIA UTILIZADA NOS ENSAIOS EM BATELADA

A eficiência de adsorção foi calculada por meio da relação percentual entre a concentração inicial (C_0) e a final (C^*) determinada no final do tempo de contato predeterminado, conforme a equação abaixo:

$$\%Ea = \frac{C_0 - C^*}{C_0} \times 100 \quad (3.1)$$

A seletividade da resina será calculada por meio da razão entre as eficiências de adsorção para cada composto nos diferentes valores de pH, sempre considerando um composto como base.

3.3.3.3 - ISOTERMAS DE EQUILÍBRIO

Os ensaios para determinação das isotermas de adsorção ou equilíbrio foram realizados também em batelada, utilizando as mesmas condições e procedimentos dos ensaios anteriores: 0,25g (em base seca) de adsorvente (mr) para 5mL de solução (V_s), mas com várias concentrações iniciais conhecidas dos compostos analisados. A faixa de concentração utilizada foi diferente para cada composto, dependendo da sua solubilidade e da concentração que este deve ser encontrado no meio de reação

Os frascos foram lacrados com rolhas de borracha e deixados sob agitação suave em mesa rotativa com temperatura controlada de de 4°C e 25°C, por um tempo de contato ($t_c=24h$ e 2h, respectivamente), para garantir que o equilíbrio foi alcançado. A concentração de soluto na amostra foi determinada por espectrofotometria de UV, medindo-se a absorbância no comprimento de onda de 240nm, utilizando-se cubeta de quartzo de 1cm de caminho ótico.

As concentrações de equilíbrio dos compostos na resina , q^* , foram determinadas pelo balanço de massa utilizando a seguinte equação:

$$q^* = \frac{(C_0 - C^*) V_L}{w} \quad (3.2)$$

onde q^* é a concentração adsorvida do composto no equilíbrio, C_0 é a concentração inicial, C^* é a concentração em solução do composto no equilíbrio, V_L é o volume de solução e w é a massa de resina utilizada.

As isotermas de equilíbrio de Langmuir, Freundlich e Linear, representadas pelas equações 3.3, 3.4 e 3.5, respectivamente, foram ajustadas aos pontos experimentais, visando a discriminação do modelo que melhor represente a cinética de adsorção nas resinas XAD-4, XAD-7 e XAD-761, para os quatro compostos de interesse.

$$q^* = \frac{q_m C^*}{K_L + C^*} \quad (3.3)$$

$$q^* = K_F C^{*n} \quad (3.4)$$

$$q^* = KC^* \quad (3.5)$$

onde:

q^* é quantidade adsorvida pela resina no equilíbrio (mg/g)

q_m é a capacidade máxima de adsorção da resina (mg/g)

C^* é a concentração da espécie que está em equilíbrio com a quantidade adsorvida (mg/mL)

K_L é a constante de equilíbrio de Langmuir (mg/mL)

K_F é a constante de equilíbrio de Freundlich (mL/mg resina)

n é um índice desta isoterma

K é a constante de equilíbrio de Henry (mL/mg resina)

3.3.4 - ENSAIOS EM COLUNA

Os ensaios em coluna tiveram o objetivo de verificar a viabilidade da utilização de uma coluna de leito fixo para separação de ampicilina a partir de uma mistura composta de ampicilina e fenilglicina. Nos ensaios na coluna foram injetados pulsos de 0,5 mL, com concentrações de 5mM na coluna K9/15 e 15mM na coluna C50. A água utilizada era destilada com pH em torno de 5,5.

A influência da temperatura, velocidade superficial, conteúdo de etanol na fase móvel e diâmetro da partícula, foram avaliados.

Para verificar-se a influência do diâmetro da partícula efetuou-se um peneiramento da resina seca em estufa a 60°C. Foram separados dois diâmetros médios de partícula, 0,033 e 0,060 cm. Os ensaios foram conduzidos variando-se a velocidade superficial para estudar-se o comportamento do leito na resolução das curvas cromatográficas de ampicilina e fenilglicina. Desta forma pode-se realizar uma comparação se esta diferença no diâmetro da partícula influencia de forma significativa a possível separação dos compostos.

O volume de vazios é determinado pelo primeiro momento dos picos eluídos de uma espécie não adsorvível alimentada em diferentes vazões, neste caso específico NaCl. A unidade experimental utilizada está ilustrada na Figura 3.2. O sistema consiste de uma bomba

peristáltica e uma válvula injetora. Para aquisição de dados foi utilizado um programa computacional (SWIFT) acoplado a um espectrofotômetro UV-Vis Pharmacia. Na primeira etapa, uma coluna de acrílico Pharmacia de 15 cm comprimento e diâmetro interno de 0.9 cm foi utilizada. As vazões de operação utilizadas variaram na faixa de 0,25 a 2,0 mL/min. Neste sistema foram determinados os parâmetros de transferência de massa e difusividade efetiva nos poros por meio da técnica de análise de momento. As curvas de saturação (breakthrough) foram determinadas em diferentes vazões e temperatura. Numa segunda etapa, para avaliar a influência de etanol na eficiência de separação do leito fixo, foi utilizada uma coluna de vidro Pharmacia de comprimento variável (20 a 50 cm) com diâmetro interno de 1cm., já que colunas de acrílico não suportam etanol.

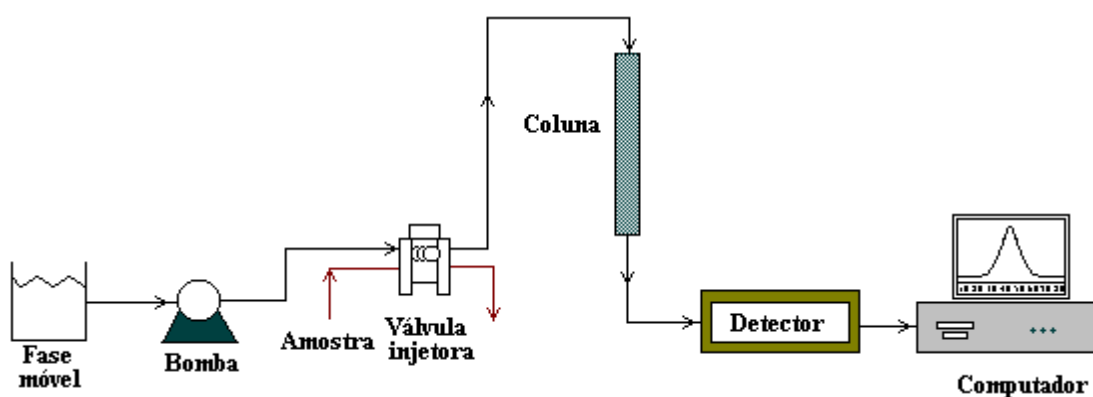


Figura 3.2 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO SISTEMA UTILIZADO PARA OS ENSAIOS EM COLUNA

3.3.5 - ANÁLISE DE MOMENTO

A análise de momento é útil para determinar os coeficientes de difusão axial e difusividades efetivas nos poros a partir de experimentos em pulso. A seqüência utilizada para análise de momento neste trabalho foi a mesma usada por Cremasco e colaboradores, 2001. Esta técnica consiste em analisar a concentração de soluto como uma função do tempo na saída de um leito fixo, em resposta a uma concentração de soluto devido a um pulso na entrada do leito. Para soluções diluídas, a curva de equilíbrio sólido-líquido pode ser representada por uma reta (Lei de Henry). A inclinação desta reta pode ser determinada a partir do primeiro momento de um pulso de soluto, o qual está associado com o tempo de retenção deste soluto.

A análise de momento foi usada para determinar os coeficientes de difusão efetiva, e os coeficientes de dispersão axial de ampicilina e fenilglicina, em soluções diluídas num leito fixo contendo resina XAD-4. A porosidade da partícula é conhecida a partir dos fabricantes. O volume total de vazios é determinado pelo primeiro momento dos picos eluídos de uma espécie não adsorvente (3g/L de NaCl) alimentada em diferentes vazões. Os parâmetros de transferência de massa são encontrados pelas análises simultâneas do 1^o e 2^o momentos dos picos de eluição dos compostos

TEORIA

Supondo-se que:

- 1- A fase móvel é uma solução diluída,
- 2- A velocidade é constante através da seção transversal da coluna,
- 3- Nenhuma reação química ocorre,
- 4- A Lei de Henry descreve a adsorção do soluto. A adsorção de NaCl é negligenciável,
- 5- A difusão intrapartícula é descrita pela difusão no poro. Para um sistema de isoterma linear, o fluxo devido a difusão na superfície, se importante, pode ser incluído no fluxo da difusão no poro,
- 6- A transferência de massa externa a partir do bulk para os poros é descrita pela transferência de massa no filme,
- 7- Os efeitos de dispersão axial são considerados.

Baseados nestas hipóteses as seguintes equações são obtidas (Schneider e Smith, 1968):

Balanco de massa de soluto na fase móvel:

A variação da concentração do soluto com o tempo, na fase móvel, pode ser descrita como:

$$\frac{\partial c}{\partial t} = E_b \frac{\partial^2 c}{\partial z^2} - v \frac{\partial c}{\partial z} - \left(\frac{1-\varepsilon}{\varepsilon} \right) \frac{6\kappa_f}{d_p} \left(c - \frac{q}{K_p} \right) \Big|_{r=R_p} \quad (3.6)$$

O primeiro termo do lado esquerdo da equação 3.6 descreve a variação da concentração de soluto devido à dispersão axial, o segundo termo representa a variação da concentração devido ao fluxo convectivo, o terceiro termo diz respeito à variação da concentração do soluto devido à transferência de massa externa, ou seja, no filme estagnado. Sendo:

c - Concentração de soluto na fase móvel dentro da partícula

q - Concentração do soluto na fase sólida

ε - Porosidade do leito

v - Velocidade intersticial

E_b - Coeficiente de dispersão axial

K_f - Coeficiente de transferência de massa no filme

d_p - Diâmetro médio das partículas da resina

Balço de massa de soluto no poro:

$$\left[\varepsilon_p + (1 - \varepsilon_p) \kappa_p \rho_p \right] \frac{\partial q}{\partial t} = \varepsilon_p D_p \frac{1}{r^2} \frac{\partial}{\partial r} \left(r^2 \frac{\partial q}{\partial r} \right) \quad (3.7)$$

Essa equação assume que a isoterma de adsorção é linear na forma $q = K_p c$. Sendo:

ε_p - Porosidade da partícula

K_p - Constante de equilíbrio de Henry ou coeficiente de partição

D_p - Coeficiente de difusão efetiva no poro

O coeficiente de dispersão axial, E_b , e a difusividade efetiva no poro, D_p , são as mesmas definidas por Ruthven (1984).

As condições Iniciais e de Contorno que descrevem uma injeção em pulso dentro de uma coluna cromatográfica são dadas como segue:

$$\text{Leito} \left\{ \begin{array}{l} Z = 0; 0 \leq t < t_0; c=c_0 \end{array} \right. \quad (3.8)$$

$$\left. \begin{array}{l} Z = 0; t > t_0; c=0 \end{array} \right\} \quad (3.9)$$

$$\left. \begin{array}{l} Z > 0; t = 0; c=0 \end{array} \right\} \quad (3.10)$$

$$\left. \begin{array}{l} Z \Rightarrow \infty; t > t_0; c=0 \end{array} \right\} \quad (3.11)$$

$$\text{Resina} \left\{ \begin{array}{l} r \geq 0; t=0; q=0 \end{array} \right. \quad (3.12)$$

$$\left. \begin{array}{l} \frac{\partial q}{\partial r} \Big|_{r=0} = 0 \end{array} \right\} \quad (3.13)$$

$$\frac{1}{K_p} \varepsilon_p D_p \frac{\partial q}{\partial r} \Big|_{r=R_p} = \frac{6\kappa_f}{d_p} \left(c - \frac{q}{K_p} \Big|_{r=R_p} \right) \quad (3.14)$$

Os primeiro e segundo momentos absolutos estão associados com a altura e largura de um pico de eluição, respectivamente. Estes parâmetros são definidos como (Miyabe and Suzuki, 1992):

$$\mu = \frac{\int_0^{\infty} c(t)t dt}{\int_0^{\infty} c(t) dt} \quad (3.15)$$

$$\sigma^2 = \frac{\int_0^{\infty} c(t)(t - \mu)^2 dt}{\int_0^{\infty} c(t) dt} \quad (3.16)$$

Schneider e Smith, 1968; Heynes, 1975, aplicaram a transformada de Laplace-Carson às equações de continuidade para o soluto, Equações.(3.6) e (3.7), e obtiveram soluções analíticas para as curvas de eluição em pulso. Substituindo a solução analítica nas Eqs. (3.15) e (3.16), pode-se obter as expressões explícitas para o 1º e 2º momentos, respectivamente,

$$\mu = \frac{L}{v} \left[1 + \left(\frac{1-\epsilon}{\epsilon} \right) K \right] + \frac{t_0}{2} \quad (3.17)$$

$$\sigma^2 = \left(\frac{2L}{v} \right) \left(\frac{E_b}{v^2} \right) \left[1 + \left(\frac{1-\epsilon}{\epsilon} \right) K \right]^2 + \left(\frac{2L}{v} \right) \left(\frac{1-\epsilon}{\epsilon} \right) K^2 \left(\frac{d_p}{6\kappa_f} + \frac{d_p^2}{60\epsilon_p D_p} \right) + \frac{t_0^2}{12} \quad (3.18)$$

onde: $K = \epsilon_p + (1 - \epsilon_p) \kappa_p \rho_p$

Determinação da Porosidade do leito, constantes de adsorção e parâmetros de transferência de massa.

Para sistemas com isotermas de adsorção linear, a eficiência de uma coluna cromatográfica pode ser avaliada pela altura equivalente a um prato teórico (HETP), que é definida de acordo com a equação de Van Deemter:

$$HETP \equiv L \left(\frac{\sigma^2}{t_R^2} \right) \quad (3.19)$$

onde:

$$\sigma'^2 = \sigma^2 - \sigma_0^2 \quad (3.20)$$

$$t_R = \mu - \mu_0 \quad (3.21)$$

onde, μ_0 e σ_0 incluem, respectivamente, o atraso na retenção e a dispersão axial devido ao “volume morto” extra coluna. Substituindo as Equações. (3.17) e (3.18) na definição (3.19), obtêm-se:

$$\text{HETP} = 2\left(\frac{E_b}{v}\right) + 2\chi^2\left(\frac{1-\varepsilon}{\varepsilon}\right)\left(\frac{d_p}{6\kappa_f} + \frac{d_p^2}{60\varepsilon_p D_p}\right)v \quad (3.22)$$

na qual:

$$\chi^2 = \left\{ K \left[1 + \frac{(1-\varepsilon)}{\varepsilon} K \right]^{-1} \right\}^2 \quad (3.23)$$

Reorganizando a Eq. 3.22 obtêm-se a seguinte equação:

$$\overset{\circ}{L} = \beta + \alpha v \quad (3.24)$$

onde o HETP corrigido é definido por:

$$\text{HETP}_{\text{corrigido}} \equiv \text{HETP} - 2\chi^2\left(\frac{1-\varepsilon}{\varepsilon}\right)\left(\frac{d_p}{6\kappa_f}\right)v \quad (3.25)$$

com:

$$\beta \equiv 2\left(\frac{E_b}{v}\right) \quad (3.26)$$

$$\alpha \equiv 2\chi^2\left(\frac{1-\varepsilon}{\varepsilon}\right)\left(\frac{d_p^2}{60\varepsilon_p D_p}\right) \quad (3.27)$$

A partir da inclinação da reta (α) e do ponto de interseção (β), da Equação (3.24) pode-se obter o coeficiente de difusão efetiva e o coeficiente de dispersão axial, respectivamente. O coeficiente de transferência no filme na Equação. (3.26), é obtido utilizando a correlação de Wilson e Geankopolis, que é válida para sistemas líquidos nos quais $0,0015 < \text{Re}_p < 55$ (Wilson e Geankopolis, 1966).

$$\text{Sh}_p \equiv \frac{d_p \kappa_f}{D_{AB}} = \frac{1,09}{\varepsilon} \text{Pe}_{M_p}^{1/3} \quad (3.28)$$

É importante notar que os valores experimentais dos 1º e 2º momentos absolutos são obtidos por integração numérica da curva cromatográfica de eluição Eqs. (3.14) e (3.15). Contudo, o valor de vazios do leito é necessário nas Equações. (3.25) e (3.27).

Neste, trabalho, o volume total de vazios foi determinado por um pulso teste de NaCl (o qual não é adsorvido pela resina) através do leito empacotado, e a porosidade da partícula é conhecida a partir da literatura (Wu et al., 1998). A relação entre o tempo de retenção de NaCl e o volume de vazios é dada por:

$$\frac{L}{t_R} = \frac{v_0}{\varepsilon + (1 - \varepsilon)\varepsilon_p} \quad (3.29)$$

onde o tempo de retenção é igual ao 1º momento. Os coeficientes de partição para ampicilina e fenilglicina são obtidos então pela seguinte equação:

$$\frac{L}{t_R} = \frac{v_0}{\varepsilon + (1 - \varepsilon)\varepsilon_p + (1 - \varepsilon)(1 - \varepsilon_p)k_p} \quad (3.30)$$

Os valores do coeficiente de difusão efetiva podem ser comparados com aqueles obtidos a partir da correlação de Mackie e Meares (1955). Esta correlação foi desenvolvida a partir das difusividades efetivas de íons em membranas.

$$D_p = \left(\frac{\varepsilon_p}{2 - \varepsilon_p} \right)^2 \frac{D_{AB}}{\varepsilon_p} \quad (3.31)$$

3.3.5.1 - SISTEMA DE OPERAÇÃO EM LEITO FIXO 1 – COLUNA K9/15

3.3.5.2 - DETERMINAÇÃO DA POROSIDADE DO LEITO E COEFICIENTES DE PARTIÇÃO

Os ensaios iniciais tiveram o objetivo de determinar a porosidade do leito e os coeficientes de partição para ampicilina e fenilglicina. Para isso, quatro experimentos foram realizados a diferentes vazões para cada soluto. Porém, antes destes experimentos foi necessário determinar-se μ_0 relacionado ao “volume morto” extra-coluna, que é o volume associado aos tubos de conexão desde o injetor da amostra até a entrada do detector, na ausência da coluna. Um pulso de 1,78 g/L de ampicilina foi introduzido no “volume morto” numa vazão de 0,5 mL/min. O procedimento foi repetido com 0,76g/L de fenilglicina. O volume morto foi determinado por:

$$V_m = Q \cdot t_m \quad (3.32)$$

Onde t_m é o tempo de retenção do pulso no centro de massa. Devido a existência deste “volume morto”, o tempo de retenção real deve ser corrigido por

$$t_R = t_{R_{exp}} - \frac{V_m}{Q} \quad (3.33)$$

Uma solução de NaCl foi usada para determinar a porosidade do leito, ϵ . Neste sentido foram realizadas corridas em diferentes vazões, de 0,25 a 2,0 mL/min, para obtenção das curvas de eluição cromatográficas. O primeiro momento, que é o tempo de retenção de cada pulso foi encontrado pela integração da curva de resposta do pulso experimental. Um gráfico de $(L/t_R) \times v_0$ foi construído de acordo com a Equação (3.26). A porosidade do leito foi determinada a partir da inclinação da reta associada com este gráfico.

3.3.5.3 - DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS DE TRANSFERÊNCIA DE MASSA

Os segundos momentos podem ser determinados a partir das curvas de eluição, como mostrado na Equação (3.12). Em seguida, para obter-se a altura do prato teórico (HETP) definido na Equação (3.16), a contribuição relacionada a dispersão extra coluna foi subtraída do segundo momento. Como neste sistema o número de Reynolds da partícula é pequeno, na faixa de 0,022 a 0,173, foi utilizada a Equação (3.25) para estimar-se o k_f .

O coeficiente de difusão molecular do NaCl (3g/L) em água, foi obtido da literatura (Cremasco e colaboradores, 2001). O valor utilizado foi $9,2 \cdot 10^{-4}$ cm²/min. No cálculo dos coeficientes de difusão moleculares da ampicilina e fenilglicina foi utilizada a correlação de Wilke-Chang, assumido-se que os compostos estavam em soluções diluídas e que seus valores de difusividades eram independentes da concentração. Os valores dos coeficientes de difusão moleculares encontrados foram $4,39 \cdot 10^{-4}$ cm²/min e $2,58 \cdot 10^{-4}$ cm²/min para fenilglicina e ampicilina, respectivamente.

Após o cálculo da resistência a transferência de massa no filme, foi possível determinar a altura do prato teórico corrigido (HETP_{corrigido}) usando a Equação (3.22), e construindo-se um gráfico (HETP_{corrigido} x v). Por meio das inclinações e dos pontos de interseção das retas, pode-se determinar os coeficientes de difusão efetivos e os coeficientes de difusão axial independentemente.

3.3.5.4 - DETERMINAÇÃO DAS CURVAS DE SATURAÇÃO E ELUIÇÃO

Nestes ensaios o objetivo foi determinar qual o limite de operação da coluna, ou seja, em que ponto seria necessária a realização da substituição da coluna por outro e conseqüente regeneração da primeira, em caso de operação contínua. Os experimentos foram realizados injetando-se continuamente soluções de ampicilina e fenilglicina em concentrações de 5mM. Estes experimentos foram realizados em diferentes vazões 0,5 a 2,0 mL/min, temperatura 10, 25 e 40 °C e quantidade de etanol 0 a 30% em volume, a fim de verificar a influência destes parâmetros no comportamento das curvas de saturação e eluição.

3.3.5.5 - PARÂMETROS PARA AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO DA COLUNA

A Equação de Van Deemter, (3.19) pode ser reescrita numa forma mais didática na seguinte forma (Snyder e colaboradores,1997) :

$$\mathbf{H} = \mathbf{A} + \frac{\mathbf{B}}{\mathbf{v}} + \mathbf{C} \mathbf{v} \quad (3.34)$$

onde v é a velocidade de escoamento, H é a altura equivalente de um prato teórico, quanto menor o prato teórico melhor a eficiência da coluna. O parâmetro A se refere à formação de caminhos preferências e está relacionado diretamente ao empacotamento da coluna. O parâmetro B está relacionado à difusão longitudinal, e depende diretamente da velocidade de escoamento da fase móvel. O parâmetro C diz respeito às resistências a transferência de massa, engloba a resistência na fase móvel, na fase móvel estagnada e na fase estacionária. A utilização da equação de Van Deemter nesta forma auxilia na discussão dos resultados obtidos

Dentre os vários parâmetros para se medir a eficiência de um processo cromatográfico, foram escolhidos o n° de pratos teóricos e a resolução para análise e comparação dos resultados obtidos. Assim, pode-se avaliar de forma mais quantitativa a influência e o comportamento das variáveis testadas. O número de pratos de teóricos pode ser calculado dividindo-se a altura da coluna pela altura do prato teórico, obtida a partir da Equação (3.19).

A resolução de duas zonas cromatográficas (Res) é definida como a distância entre os centros das zonas (d) dividida pela média das larguras (w) das mesmas. A resolução pode ser melhorada afastando-se os centros das zonas (aumentando a seletividade) e/ou diminuindo a largura das zonas (aumento a eficiência, ou seja, o aumentando o n° de pratos teóricos). A distância entre os centros das zonas cromatográficas é geralmente determinado pela diferença entre os tempos de retenção das mesmas. A Figura 3.3 representa esquematicamente duas zonas cromatográficas e mostra os parâmetros envolvidos no calcula da resolução entre estas zonas

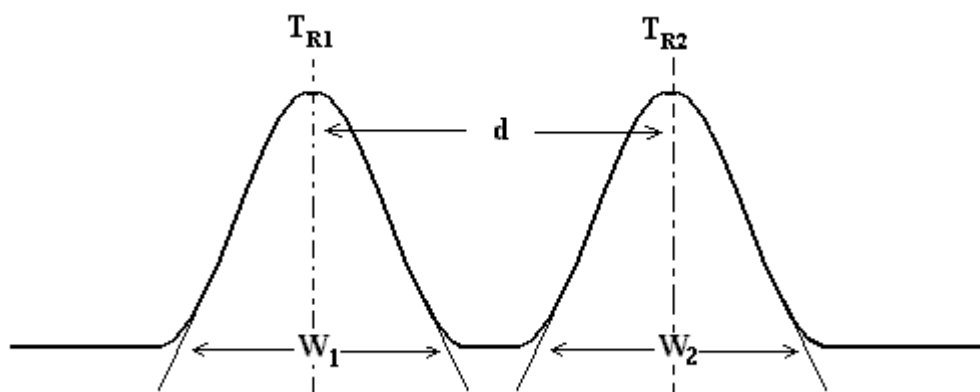


Figura 3.3 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DE DUAS ZONAS CROMATOGRÁFICAS (SNYDER E COLABORADORES, 1997)

A Equação (3.35) demonstra como se efetua o cálculo da resolução entre as zonas cromatográficas apresentadas na Figura 3.3. T_{R2} e T_{R1} representam os tempos de retenção dos compostos enquanto w_2 e w_1 são as respectivas larguras dos picos nas suas bases (Snyder e colaboradores, 1997).

$$R_{es} = \frac{2 (T_{R2} - T_{R1})}{(w_2 + w_1)} \quad (3.35)$$

3.3.6 - SISTEMA DE OPERAÇÃO EM LEITO FIXO 2 – COLUNA 50

No sistema de operação 2 que é representado pela utilização da Coluna C50, foram realizados os ensaios para determinação da influência da presença de etanol na fase móvel sobre as curvas de eluição da ampicilina e fenilglicina. O objetivo destes ensaios era verificar o comportamento de cada composto na presença de tal solvente, e assim avaliar-se a possibilidade da utilização do etanol como uma etapa de concentração dos compostos.

Neste mesmo sistema foram realizados testes com misturas de ampicilina e fenilglicina com o objetivo de se determinar a influência da presença do solvente na eficiência de separação dos compostos.

Em ambos os casos, a coluna era preenchida com a resina já na concentração desejada de etanol, ou seja, a resina estava nas condições do ensaio previamente ao seu

empacotamento. As composições das fases móveis utilizadas, 15, 30 e 50% de etanol presente foram preparadas todas usando relação volume/volume.

Os pulsos das amostras de ampicilina, fenilglicina e da mistura, foram efetuados com estas amostras tendo sido preparadas contendo a concentração de etanol da fase móvel, ou seja, os pulsos dos compostos já continham a concentração de etanol da fase móvel que estava sendo testada.

3.3.7 - ENSAIOS DE PRECIPITAÇÃO NO PONTO ISOELÉTRICO

Os ensaios de precipitação no ponto isoelétrico tiveram o objetivo de verificar a eficiência de separação de ampicilina a partir de uma mistura de cristais de ampicilina e fenilglicina. Esta mistura foi preparada a partir das substâncias puras de ambos compostos, de forma a simular as condições encontradas durante a síntese enzimática de ampicilina. Foram testadas as influências do pH, temperatura e ácidos distintos usados atingir o ponto isoelétrico do antibiótico, ácido clorídrico e ácido sulfúrico.

Os ensaios para precipitação de ampicilina no seu ponto isoelétrico foram conduzidos pesando-se uma massa de ampicilina e fenilglicina de forma a ultrapassar o limite de solubilidade dos compostos a valores de pH elevados. Em seguida a mistura era solubilizada com uma solução de NaOH concentrado, elevando-se o pH a 8,5 ou 9,0 dependendo do ensaio. O objetivo desta etapa era determinar qual pH apresentava melhor relação entre solubilizar o máximo de ampicilina e o mínimo de fenilglicina. Após, era realizada uma filtração desta solução, obtendo-se uma massa contendo, praticamente, cristais puros de fenilglicina no resíduo. O filtrado contendo uma mistura de ampicilina e fenilglicina era então acidificado com ácido concentrado (HCl ou H₂SO₄) baixando-se o pH para 4,9, que é o ponto isoelétrico da ampicilina e por isso seu pH de menor solubilidade. A ampicilina precipitada era separada por filtração da solução mãe. O filtrado obtido era uma solução contendo ampicilina e fenilglicina em concentrações abaixo dos seus respectivos limites de solubilidade. A Figura 3.4 ilustra a seqüência de etapas utilizadas nos experimentos de precipitação no ponto isoelétrico de ampicilina.

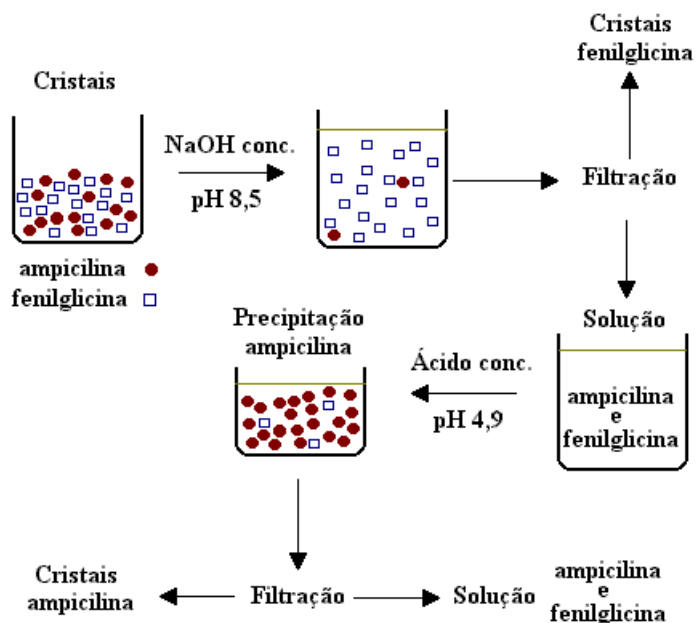


Figura 3.4 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA SEQUÊNCIA UTILIZADA NOS ENSAIOS DE PRECIPITAÇÃO NO PONTO ISOELÉTRICO DA AMPICILINA.

3.3.8 - CURVAS DE CALIBRAÇÃO

Utilizou-se um espectrofotômetro UV modelo ULTRASPEC 2000, para leitura das concentrações de AMPI, EMFG, 6-APA e FG nos experimentos realizados em batelada. O comprimento de onda utilizado (λ) foi 240nm. A escolha por este comprimento foi feita visando minimizar o erro devido ao efeito de diluição. Comprimentos de onda abaixo de 240nm apresentam maior sensibilidade, mas por outro lado, uma faixa menos ampla de trabalho. As Figuras 3.5, 3.6, 3.7 e 3.8, apresentam as curvas de calibração para o EMFG, AMPI, 6-APA e FG, em diferentes valores de pH, utilizando comprimento de onda de 240nm.

Como pode ser observado nas Figuras 3.5, 3.6, 3.7 e 3.8, os ajustes lineares apresentaram correlações excelentes, demonstrando que as curvas de calibração podem ser aplicadas dentro das faixas de concentração utilizadas.

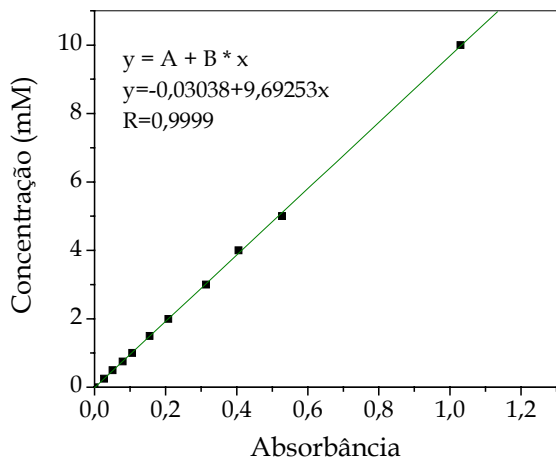


Figura 3.5 - CURVA DE CALIBRAÇÃO PARA O EMFG A 240NM PH=6,5

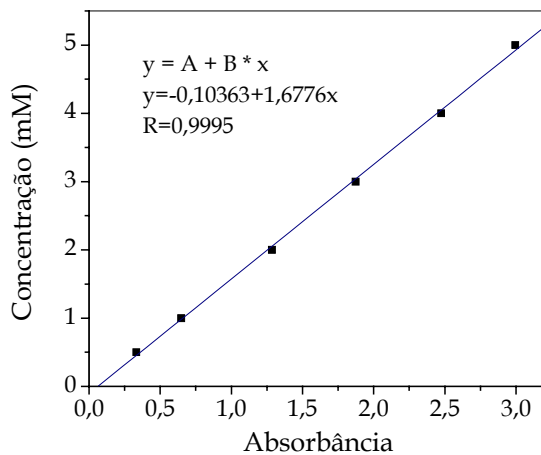


Figura 3.6 - CURVA DE CALIBRAÇÃO PARA O 6-APA A 240NM PH=6,5

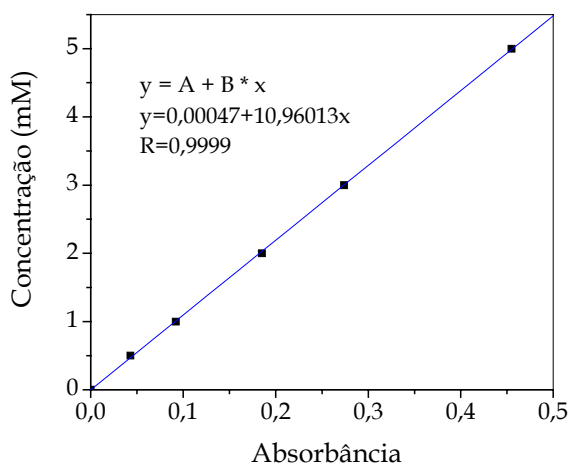


Figura 3.7 - CURVA DE CALIBRAÇÃO PARA FG A 240NM PH=6,5

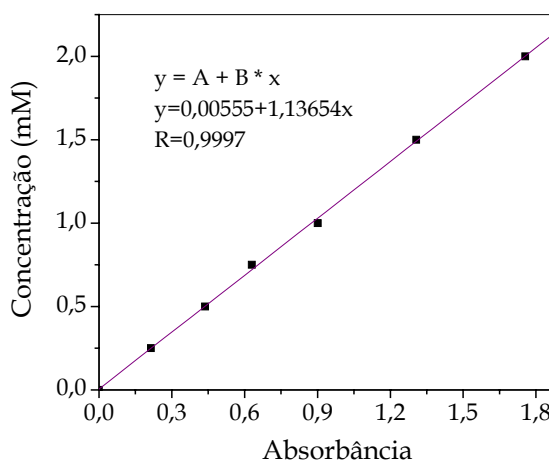


Figura 3.8 - CURVA DE CALIBRAÇÃO PARA AMPI A 240NM PH=6,5

Esta metodologia pode ser aplicada apenas para os ensaios com as substâncias puras. Para os experimentos com mistura dos compostos, a determinação das concentrações foi realizada utilizando-se o sistema de coluna líquida de alta performance (HPLC).

3.3.9 - ANÁLISES DAS CONCENTRAÇÕES DOS SUBSTRATOS E PRODUTOS DE SÍNTESE

As concentrações de EMFG, AMPI, 6-APA e FG foram determinadas usando HPLC:

- Coluna C18 Analysis Vinicus: MFE-SIL 5 μ m, 10cm de comprimento 4,6mm de diâmetro ou coluna C18 Waters: Nova-Pak, C18, 60Å, 4 μ m, 3.9x150mm;
- Vazão = 1,5 ml/min
- Comprimento de onda (λ) = 215 nm

Duas fases móveis diferentes foram utilizadas:

- Fase móvel 1: 27% acetonitrila, 2‰ SDS (Lauryl sodium sulphate); tampão fosfato 12mM e pH 2,6 a 25°C para a coluna C18 Analysis Vinicus e
- Fase móvel 2: 35% acetonitrila, 2‰ SDS (Lauryl sodium sulphate); 0,01M H₃PO₄, 0,005M K₂H₂PO₄ e pH 4,6 a 25°C para a coluna C18 Waters.

A Figura 3.9 apresenta um cromatograma típico obtido para uma amostra contendo: fenilglicina, 6-APA, ampicilina e éster metílico de fenilglicina. A concentração das espécies químicas presentes na amostra era obtida por comparação do cromatograma obtido com uma curva de calibração previamente elaborada.

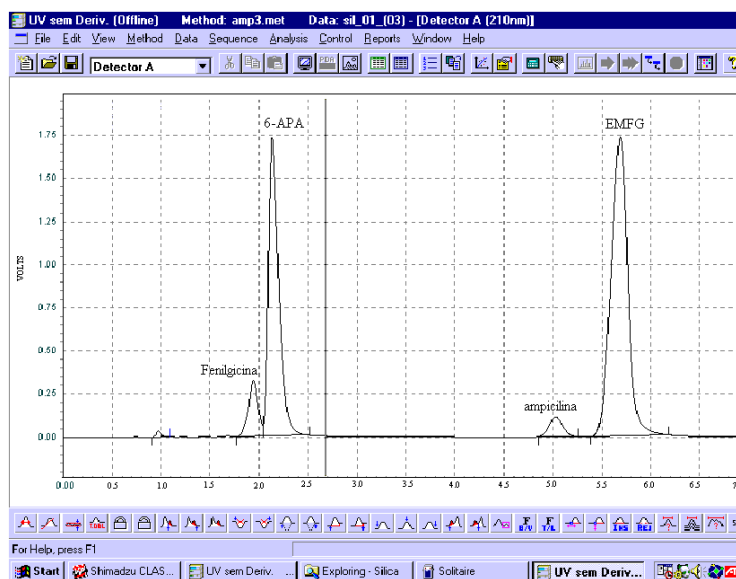


Figura 3.9 - CROMATOGRAMA DOS COMPOSTOS ANALISADOS EM HPLC

4. Resultados e Discussão

4.1 - ENSAIOS PRELIMINARES

Os ensaios preliminares tiveram como objetivo determinar e/ou confirmar, dados referentes as constantes de dissociação, por conseqüência os pontos isoelétricos, e o comportamento da solubilidade dos compostos com a variação do pH. A determinação deste tipo de dado é fundamental para definir a forma e o tipo de processo de separação a ser utilizado na purificação do composto de interesse.

Como apresentado no capítulo 2, o conhecimento das constantes de dissociação dos compostos nos fornece duas valiosas informações, que são indispensáveis para avaliar que tipo de seqüência de separação seria a mais apropriada: a primeira informação é a disposição de cargas apresentada pelo composto ao longo da faixa de pH, ou seja, os compostos com característica aminoácida apresentam três possíveis formas em solução, podem estar carregados positivamente, negativamente ou neutros. Esta última situação é encontrada no seu ponto isoelétrico, ponto onde a carga elétrica líquida é nula. Esta informação nos permite escolher um determinado pH de forma que os compostos apresentem uma diferença de carga e possibilitando assim sua separação. Processos do tipo eletroforese, focalização isoelétrica e adsorção por troca-iônica são exemplos de processos que podem ser utilizados, e necessitam deste tipo de conhecimento. A segunda informação diz respeito ao próprio ponto isoelétrico que além de ser o ponto de carga global nula é também o ponto no qual os compostos possuem a sua menor solubilidade. Esta informação nos permite otimizar a precipitação ou cristalização de um determinado composto alterando o pH da solução para o ponto isoelétrico do mesmo.

A solubilidade por si só já é um parâmetro chave para qualquer processo, seja este uma reação ou separação, pois conhecendo o comportamento da solubilidade dos compostos como função do pH, pode-se precipitar ou solubilizar um composto em detrimento dos outros apenas devido à variação do pH da solução. A importância deste parâmetro é potencializada num processo específico como é a síntese enzimática de ampicilina, onde a enzima pode degradar o antibiótico recém formado e que esteja em solução. Desta forma, torna-se de

grande interesse a busca pela maior precipitação possível de ampicilina para que seja minimizada a sua perda devido à ação hidrolase da enzima.

Outro fator a ser levado em consideração é a falta de informação sobre purificação de ampicilina produzida a partir da síntese enzimática, bem como sobre as características dos compostos, como por exemplo, o efeito do pH na solubilidade destes. Mesmo a restrita bibliografia existente, além de ser recente, muitas vezes apresenta resultados um pouco discrepantes entre os autores. Sendo assim, se decidiu iniciar a investigação das constantes de dissociação e da solubilidade dos compostos antes da escolha do processo de separação a ser utilizado e até mesmo das etapas que poderiam envolver este processo.

A Figura 4.1 apresenta o comportamento da solubilidade da ampicilina e da fenilglicina com o pH. Pode ser observado que a ampicilina sofre um aumento significativo na sua solubilidade, apresentando 19mM a pH 5,5 e alcançando 50mM a pH 7,5. Logo, se o objetivo for precipitar a ampicilina, deve-se optar por trabalhar em valores de pH abaixo de 6,5. A fenilglicina não apresentou grande variação na sua solubilidade, um leve aumento foi verificado com o aumento do pH, 22mM e 27mM para os valores de pH 5,5 e 7,5, respectivamente. Como o pH da reação de síntese de ampicilina está na faixa de 6,2 a 6,5 é praticamente inevitável a precipitação da fenilglicina formada, principalmente quando se inicia com altas concentrações de substrato.

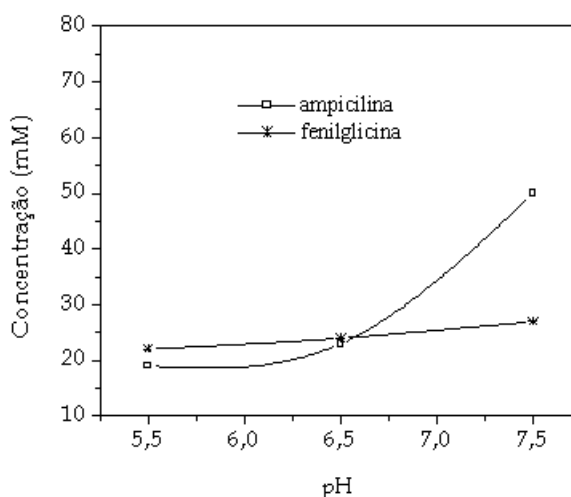


Figura 4.1 -SOLUBILIDADE AMPICILINA E FENILGLICINA EM ÁGUA À 25°C FUNÇÃO DO PH

Youshko e colaboradores, 2000 também chegaram às estas conclusões com respeito à precipitação de fenilglicina, e afirmam que a precipitação de ampicilina somente pode ser efetiva em valores de pH abaixo de 7,5.

A Figura 4.2 mostra o comportamento da solubilidade de 6-APA e EMFG com a variação do pH. A primeira observação a ser feita é com respeito ao comportamento antagônico da solubilidade dos compostos com o aumento do pH, isto é, enquanto a solubilidade do EMFG apresenta uma diminuição significativa, a solubilidade do 6-APA aumenta consideravelmente. Este comportamento é o principal problema na síntese enzimática de ampicilina, pois no pH onde se consegue alta solubilidade do EMFG não ocorre o mesmo com o 6-APA e vice-versa. A análise da Figura 4.2 ilustra de forma enfática a importância do pH na solubilidade dos compostos e como esta pode variar de forma drástica. No caso do EMFG, a solubilidade cai de 2,3M para em torno de 0,75M nos valores de pH 4,5 e 7,5, respectivamente. Por outro lado o 6-APA apresenta um aumento considerável de 45mM em pH 4,5 para 1,9M em pH=7,5.

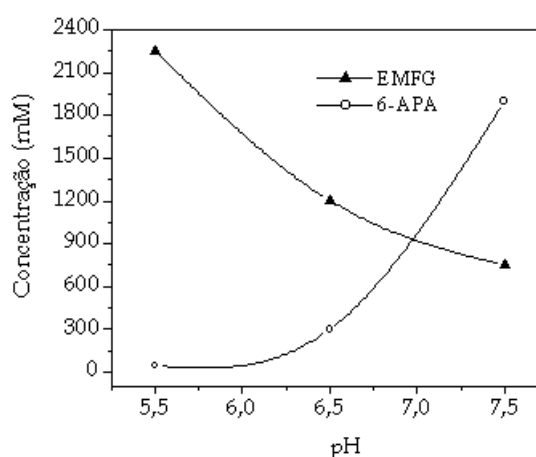


Figura 4.2 -SOLUBILIDADE EMFG E 6-APA EM ÁGUA À 25°C COMO FUNÇÃO DO PH

Os resultados de solubilidade apresentados nas Figuras 4.1 e 4.2 estão de acordo com os encontrados em literatura (Youshko e colaboradores, 2000; Diender e colaboradores, 1998; Rudolph e colaboradores, 1999). Determinadas as solubilidades dos compostos a próxima etapa foi a determinação de seus pontos isoelétricos.

A Tabela 4.1 apresenta os valores das constantes de dissociação e dos pontos isoelétricos da ampicilina, 6-APA, fenilglicina e EMFG em função do conteúdo de metanol presente na solução.

Tabela 4.1- CONSTANTES DE DISSOCIAÇÃO E PONTOS ISOELÉTRICOS DOS COMPOSTOS COMO FUNÇÃO DO CONTEÚDO DE METANOL

Metanol %(v/v)	FG			Ampicilina			6-APA			EMFG
	pK ₁	pK ₂	pI	pK ₁	pK ₂	pI	pK ₁	pK ₂	pI	pK ₂
0	1,96	9,02	5,49	2,66	7,24	4,95	2,47	4,93	3,70	6,89
15	1,98	9,01	5,50	2,77	7,27	5,02	2,54	4,89	3,72	6,79
30	1,99	9,03	5,51	2,81	7,27	5,04	2,71	4,94	3,82	6,70
50	2,03	9,03	5,53	3,13	7,27	5,20	2,75	4,95	3,85	6,65

Com base nos resultados apresentados na Tabela 4.1, pode-se concluir que os valores de pK tanto do grupo carboxil (pK₂) quanto do grupo amino (pK₁) do 6-APA não apresentaram variação significativa, o que está de acordo com os resultados obtidos por Kim e Lee (1996 (a e b)). Estes autores concluíram que, poderia se assumir com constantes os valores de pKs do 6-APA para misturas de metanol-água até 40%(v/v).

A queda suave apresentada pelo pK₂ do EMFG, pois este composto apresenta apenas o grupo amino protonado, também está em concordância com os resultados apresentados por Kim e Lee (1996 a e b), que verificaram este mesmo comportamento para o EMFG. Estas observações já haviam sido constatadas por Fernandes-Lafuente e colaboradores, (1991).

Variações pequenas também foram encontradas para os valores de pK₁ e pK₂ para Ampicilina e Fenilglicina para misturas de metano-água até 40%(v/v), o que indica que nas condições de operação da reação não deverão ocorrer variações importantes nos pontos isoelétricos dos compostos, já que a concentração de metanol no meio reacional, não deverá superar 10%(v/v).

4.2 - DETERMINAÇÃO DAS EFICIÊNCIAS DE ADSORÇÃO

Este conjunto de experimento teve como objetivo determinar a capacidade de adsorção das resinas disponíveis frente aos compostos envolvidos na síntese enzimática de ampicilina.

Primeiramente, foram avaliadas as influências da temperatura e pH nas eficiências de adsorção das resinas e na seletividade. Estes ensaios forneceram importantes informações para que fossem escolhidas as condições para determinação das isotermas de adsorção. Parâmetros como, tempo de contato, pH e temperatura foram determinados nesta fase do trabalho.

A eficiência de adsorção foi definida como:

$$\%EA = (1 - C^*/C_0) * 100$$

onde: C^* é a concentração em solução do composto e C_0 é a concentração inicial do mesmo. Assim quando nos referimos a uma eficiência de adsorção de 40%, significa que a resina adsorveu 40% da concentração inicial do composto. Para efeito de comparação foram utilizadas a mesma concentração inicial para todos os compostos, 5mM.

A seletividade apresentada nos próximos itens foi calculada efetuando-se a razão entre as eficiências de adsorção de dois compostos. Por exemplo, a seletividade EMFG/FG, significa que foram divididos os valores de eficiência obtidos para a adsorção do EMFG pelos valores de eficiência alcançados para FG.

4.2.1 - DETERMINAÇÃO DO TEMPO DE EQUILÍBRIO

O tempo necessário para atingir o equilíbrio depende da velocidade de adsorção, portanto da afinidade entre matriz e o composto a ser adsorvido, e da temperatura de adsorção. O fenômeno está ilustrado nas Figuras 4.3 e 4.4, que apresentam os resultados a 25°C e 4°C, respectivamente. A comparação entre os tempos de contato obtidos nas diferentes temperaturas mostra que o estado de equilíbrio a 25°C foi atingido com 2 horas enquanto à temperatura de 4°C necessitou de 24 horas para alcançar seu equilíbrio. Este comportamento de diminuição do tempo de necessário para se atingir o equilíbrio de adsorção dos compostos, pode ser um efeito do aumento da temperatura de 4°C para 25°C que conduziu a um aumento da velocidade de adsorção, assim como um aumento no transporte de massa na temperatura mais elevada.

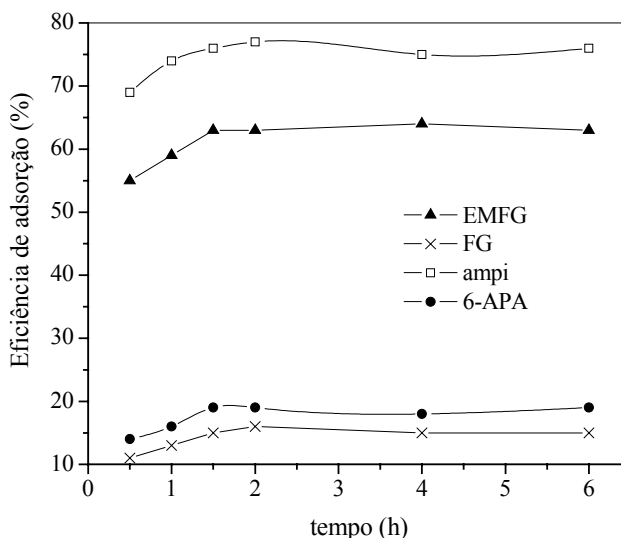


Figura 4.3 -TESTE DE EQUILÍBRIO UTILIZANDO RESINA AMBERLITE XAD-4 (T=25°C, PH=6,5, VS=5mL, CO=5mM, mR=0.25G)

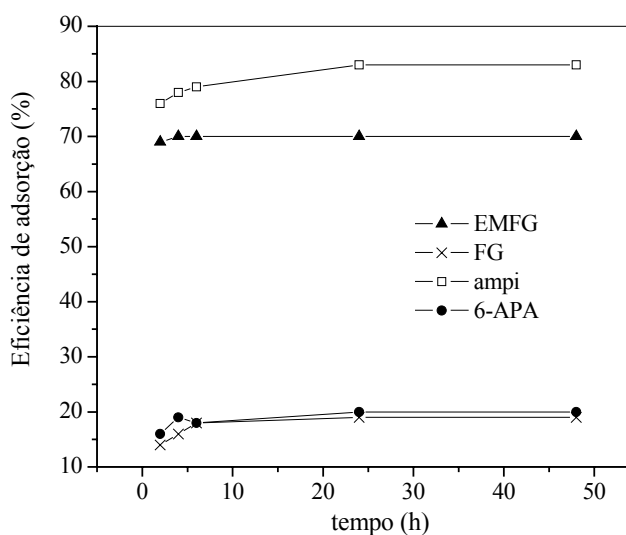


Figura 4.4 -TESTE DE EQUILÍBRIO UTILIZANDO RESINA AMBERLITE XAD-4 (T=4°C, PH=6,5, VS=5mL, CO=5mM, mR=0.25G)

Em ambas temperaturas pode-se notar que tanto a fenilglicina como o 6-APA alcançaram seus equilíbrios em tempos de contato menores, ou seja, atingem seus estágios de equilíbrio de adsorção mais rápido. Este comportamento está diretamente ligado ao fato destes compostos apresentarem baixa interação com a resina, o que faz com que necessitem de tempos de contato menores para que atingem seus equilíbrios.

Na Tabela 4.2 são apresentados os resultados de eficiência de adsorção utilizando-se as resinas XAD-4, XAD-7 e XAD-761 nas duas temperaturas. Pode-se observar que para as três resinas o efeito da temperatura mostrou o mesmo comportamento, ou seja, as maiores eficiências foram obtidas na temperatura de 4°C, o que também já era um efeito esperado. Este resultado pode ser explicado devido ao frágil equilíbrio atingido na interação hidrofóbica entre o adsorvente polimérico e os compostos (forças de Van der Waals).

Tabela 4.2- COMPARAÇÃO DAS EFICIÊNCIAS DE ADSORÇÃO A 4°C E 25°C UTILIZANDO AS RESINAS XAD-4, XAD-7 E XAD 761 (PH=6,5, VS=5ML, CO=5MM, MR=0,25G)

	XAD-4		XAD-7		XAD-761	
	4°C	25°C	4°C	25°C	4°C	25°C
fenilglicina	19	15	18	15	18	15
EMFG	70	63	56	54	64	51
6-APA	20	19	10	10	25	17
ampicilina	79	76	58	32	56	49

- Todos os valores de eficiência de adsorção estão em percentagem

Com o aumento da temperatura este equilíbrio é deslocado no sentido da dessorção dos compostos, ou seja, afeta negativamente o processo de adsorção, diminuindo o efeito da interação hidrofóbica. Devido à reação de adsorção ser um processo exotérmico, um aumento na temperatura conduz a uma diminuição no grau de avanço da reação. Pode ser observado também na Tabela 4.2, que o aumento na eficiência de adsorção a 4°C e tempos de contato de 24 horas, não foi de grande magnitude. Optou-se assim pela continuidade do estudo a 25°C, uma também provável temperatura de reação, com tempos de contato de 2 horas. Os resultados da Tabela 4.2 demonstram que a resina XAD-4 apresentou os melhores resultados de eficiência de adsorção do EMFG e ampicilina, atingindo 79% e 70%, respectivamente, ambos à temperatura de 4°C. A eficiência de adsorção de fenilglicina foi praticamente a mesma para as três resinas, enquanto a resina XAD-761 demonstrou uma eficiência de adsorção de 25% para o 6-APA à 4°C.

4.2.2 - EFEITO DO pH NA EFICIÊNCIA DE ADSORÇÃO

Devido á falta de informação disponível na literatura sobre a utilização da resina Amberlite XAD-4, XAD-7 e Duolite XAD-761 para adsorção de ampicilina, EMFG, 6-APA e fenilglicina , foi necessário a realização de experimentos que verificassem o comportamento da eficiência de adsorção desta resina com relação aos compostos mencionados, ou seja, era necessário determinar se a resina possuía ou não capacidade de interagir com os compostos.

Neste sentido, foram realizados os experimentos para determinar o perfil da eficiência de adsorção de ampicilina, EMFG, 6-APA e fenilglicina ao longo de uma faixa de pH (4,5 a 8,5) utilizando as resinas XAD-4, XAD-7 e XAD-761. Observou-se que o pH influenciou diretamente as eficiências de adsorção com maior ou menor intensidade dependendo do composto analisado e da resina utilizada. Essa influência está apresentada nas Figuras 4.5, 4.6 e 4.7, utilizando-se as resinas XAD-4, XAD-7 e XAD-761, respectivamente.

4.2.2.1 - EFEITO DO pH NA EFICIÊNCIA DE ADSORÇÃO - RESINA XAD-4

Conforme pode ser visto na Figura 4.5, o pH influencia nas eficiências de adsorção com maior ou menor intensidade dependendo do composto analisado. O EMFG é o composto que sofreu maior variação de eficiência de adsorção com o aumento do pH, iniciando com 37% a pH 4,5 e atingindo um valor máximo de 89% a pH 8,5. Uma das possíveis explicações para este comportamento pode estar relacionada com a estrutura química do EMFG, que possui apenas um grupo protonável, o grupo amino, com pK em torno de 6,8. Isto significa que a medida que o pH aumenta, mais moléculas de EMFG se tornam neutras e com maior afinidade pela resina hidrofóbica, resultando num maior número de moléculas adsorvidas.

A ampicilina apresentou uma queda sensível na sua eficiência de adsorção, de 82% para 70% nos valores de pH 4,5 e 8,5 respectivamente. Este comportamento deve estar relacionado com o valor do ponto isoelétrico da ampicilina , em torno de 4,9 (pKa 2,3 e pKb 7,5). A grande maioria das moléculas está neutra a valores de pH próximos desse valor, o que favorece interações hidrofóbicas. A medida em que se aumenta o pH, o número de moléculas com grupo amino desprotonado (neutro) aumenta, resultando num aumento do número de moléculas com carga global negativa e portanto com menor afinidade pela resina hidrofóbica.

A fenilglicina não apresentou alteração significativa na sua eficiência de adsorção, que foi em torno de 15% ao longo da faixa de pH estudada. Isso também ser explicado pelo ponto isoelétrico de fenilglicina que é 5,7, mais alto que o de ampicilina, consequência do alto valor de pK_b do grupo amino, 9,3. Dessa forma, na faixa de pH estudada, a concentração de grupos amino protonados e portanto carregados positivamente diminui muito lentamente, permanecendo, em consequência, quase a totalidade das moléculas no mesmo estado de ionização de 4,5 até 8,5. Além disso, a parte da molécula que melhor interage com a resina deve ser o grupo fenil. O grupo amino está próximo do grupo fenil e o seu estado de ionização deve ter grande peso na qualidade final da interação.

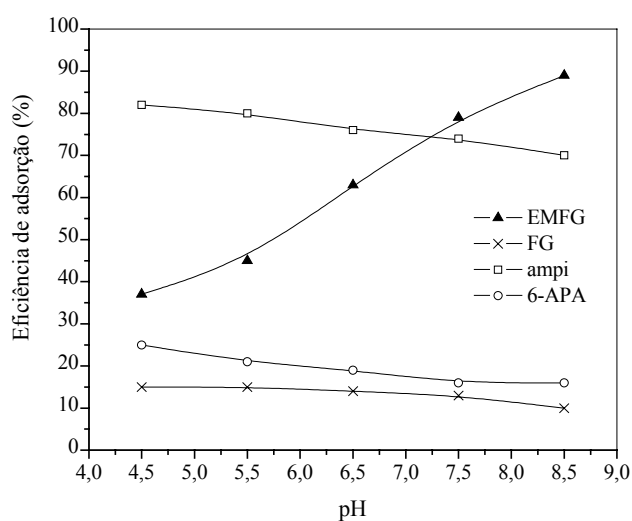


Figura 4.5 -EFEITO DO PH SOBRE A EFICIÊNCIA DE ADSORÇÃO - RESINA XAD-4

Assim, para ampicilina a eficiência sofre pequena mas ainda significativa influência do pH, mas fenilglicina, que permanece com praticamente todas as moléculas com o grupo amino carregado em toda a faixa estudada de pH, a eficiência pouco varia. A mesma linha de raciocínio explica a queda na eficiência de adsorção do 6-APA com o aumento do pH, de 25% a pH 4,5 para 16% a pH 8,5. O baixo valor de pK_b do grupo amino (ponto isoelétrico 3,7) implica aumento da carga global negativa da molécula com o aumento do pH, com consequente queda na eficiência de adsorção. A Tabela 4.3 mostra a seletividade das resinas XAD-4, XAD-7 e XAD-761 para ampicilina em relação aos outros compostos em vários valores de pH.

4.2.2.2 - EFEITO DO pH NA EFICIÊNCIA DE ADSORÇÃO - RESINA XAD-7

Pode ser observado na Figura 4.6, que o pH também influenciou significativamente a adsorção dos compostos sobre a resina XAD-7, com exceção feita a fenilglicina que, novamente, não apresentou alteração no seu nível de adsorção ao longo da faixa de pH estuda. A eficiência de adsorção média da fenilglicina ficou em torno de 10%, menor do que a obtida utilizando a resina XAD-4.

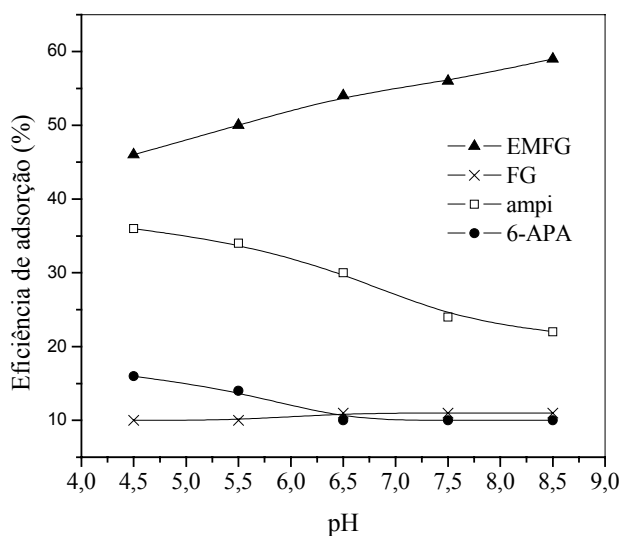


Figura 4.6 -EFEITO DO pH SOBRE A EFICIÊNCIA DE ADSORÇÃO - RESINA XAD-7

Devido à característica moderadamente hidrofóbica da resina XAD-7, este resultado parece coerente, ou seja, uma menor afinidade ficou estabelecida entre a resina e a fenilglicina. Mesmo esta menor afinidade não foi alterada com a variação do pH resultando num comportamento semelhante ao observado com a resina XAD-4, ou seja, o pH não influenciou a eficiência de adsorção de fenilglicina, pelos mesmos motivos discutidos anteriormente.

Pode-se notar que o EMFG apresentou um aumento sensível na sua eficiência de adsorção, iniciando com 45% a pH 4,5 e alcançando 67% a pH 8,5. Este aumento da eficiência de adsorção segue o mesmo princípio discutido para a resina XAD-4, porém deve-se notar que os valores obtidos com a resina XAD-7 são bem inferiores aos alcançados com a resina XAD-4. Os valores mais baixos obtidos com a XAD-7 podem ser explicados devido a sua característica estrutural, pois esta resina, diferente da XAD-4, é apenas moderadamente

hidrofóbica. Por esta razão, é bem aceitável que a influência do variação do pH cause uma menor alteração no nível de adsorção do EMFG do que na resina XAD-4 que tem característica hidrofóbica. Mesmo assim, pode-se verificar que o comportamento da eficiência de adsorção do EMFG encontrado com a resina XAD-7 é o mesmo da resina XAD-4, ou seja, em ambos os casos o aumento do pH conduziu a um aumento da eficiência de adsorção do composto.

Como pode ser observada, a ampicilina apresentou uma diminuição na sua eficiência de adsorção sobre a resina XAD-7 com o aumento do pH, o que está de acordo com o comportamento observado utilizando-se a resina XAD-4. Porém, apesar do mesmo comportamento, é possível notar que a queda na eficiência de adsorção observada foi mais expressiva utilizando-se a resina XAD-7, 37% para 21% nos valores de pH 4,5 e 8,5, respectivamente do que com a resina XAD-4, 83% e 70% nos mesmo valores de pH. Devido ao fato da resina XAD-7 ter uma característica de menor hidrofobicidade do que a resina XAD-4, e isto pode explicar os valores mais baixos de eficiência de adsorção de ampicilina, é coerente que, a influência do pH tenha sido mais significativa sobre a interação ampicilina - XAD-7 do que sobre a interação ampicilina - XAD-4. Em outras palavras, a característica funcional moderadamente hidrofóbica apresentada pela resina XAD-7, conduz à uma interação mais frágil e por esse motivo mais suscetível a variação do pH.

A queda na eficiência de adsorção do 6-APA apresentada pela resina XAD-7, devido ao aumento do pH, de 17% a pH 4,5 para 10% a pH 8,5 também está de acordo com o comportamento apresentado pela resina XAD-4, 25% e 16%, nos mesmos valores de pH. Apesar dos valores serem menores com a resina XAD-7, a queda verificada em ambas resinas é praticamente a mesma, demonstrando que a interação do 6-APA com as duas resinas é afetada de forma semelhante. Este comportamento pode estar relacionado com as baixas eficiências de adsorção encontradas em ambos os casos, ou seja, com o 6-APA não possui uma grande afinidade por nenhuma das resinas, o efeito do pH é sentido da mesma forma por estas, independente dos valores de eficiência de adsorção alcançados com a resina XAD-4 estarem acima dos encontrados com a resina XAD-7.

4.2.2.3 - EFEITO DO pH NA EFICIÊNCIA DE ADSORÇÃO - RESINA XAD-761

Devido a característica de alta hidrofobicidade apresentada pelas resinas XAD-761 e XAD-4, é possível notar que o comportamento das eficiências de adsorção de EMFG, ampicilina, 6-APA e fenilglicina utilizando a resina XAD-761 se assemelha muito ao encontrado com a resina XAD-4. Contudo os valores de eficiência de adsorção encontrados diferem consideravelmente entre as duas resinas, bem como as variações apresentadas ao longo da faixa de pH.

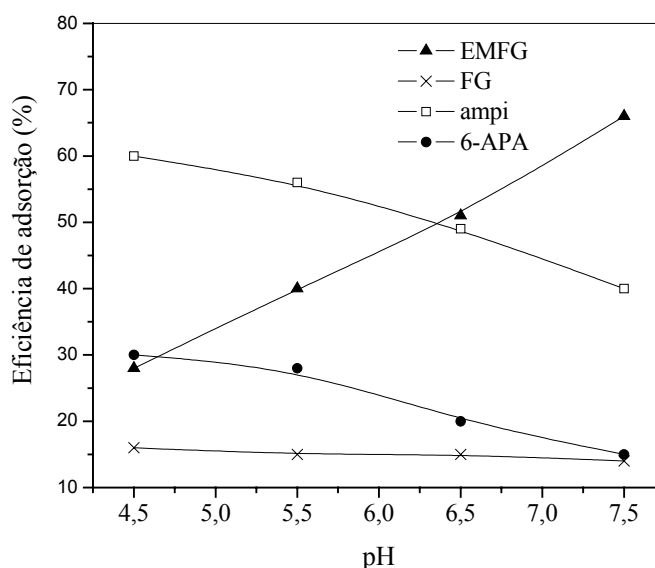


Figura 4.7 -EFEITO DO pH SOBRE A EFICIÊNCIA DE ADSORÇÃO - RESINA XAD-761

Conforme pode ser visto na Figura 4.7, o EMFG apresentou uma considerável variação da sua eficiência de adsorção com o aumento do pH, partindo de 28% a pH 4,5 e atingindo um valor máximo de 78% a pH 7,5. Este comportamento é semelhante ao obtido com a resina também hidrofóbica XAD-4, 37% a pH 4,5 e 89% a pH 8,5 e portanto, a discussão apresenta anteriormente à resina XAD-4 se aplica à resina XAD-761.

A fenilglicina não apresentou variação significativa na sua eficiência de adsorção na resina XAD-761 que ficou em torno de 15%, ao longo de toda a faixa de pH utilizada. O mesmo valor de eficiência de adsorção já havia sido encontrado utilizando a resina XAD-4. Este perfil de comportamento foi encontrado para todas as resinas utilizadas o que parece comprovar a idéia de que, a concentração de grupos amino protonados e portanto carregados positivamente diminui muito lentamente, permanecendo, em consequência, quase a totalidade das moléculas no mesmo estado de ionização de 4,5 até 7,5 e ainda, devido ao grupo amino

estar próximo do grupo fenil, o seu estado de ionização deve ter grande peso na qualidade final da interação.

A ampicilina apresentou forte queda na sua eficiência de adsorção, 60% a pH 4,5 e 46% a pH 7,5, utilizando-se a resina XAD-761 com o aumento do pH. Da mesma forma que para a resina XAD-4, a medida em que se aumentou o pH, o número de moléculas com grupo amino desprotonado (neutro) aumenta, resultando num aumento do número de moléculas com carga global negativa e, portanto, com menor afinidade pela resina hidrofóbica. Aparentemente, o aumento da carga global negativa teve uma influência mais significativa sobre o equilíbrio alcançado com a resina XAD-761 do que com a resina XAD-4, o que, provavelmente, está relacionado com as suas características estruturais.

O 6-APA apresentou queda na sua eficiência de adsorção devido ao aumento do pH, 31% a pH 4,5 e 15% a pH 7,5. Este mesmo comportamento foi verificado quando se utilizou a resina XAD-4, 25% a pH 4,5 para 16% a pH 8,5. Desta forma parece razoável concluir que o baixo valor de pK_b do grupo amino (ponto isolétrico 3,7) implica aumento da carga global negativa da molécula com o aumento do pH, com conseqüente queda na eficiência de adsorção, já que para ambas resinas encontrou-se o mesmo comportamento.

A Tabela 4.3 apresenta um resumo comparativo das seletividades obtidas para ampicilina em relação aos demais compostos com as três resinas testadas.

Como pode ser observada na Tabela 4.3, a resina XAD-761 apresentou seu maior valor de seletividade para ampicilina /fenilglicina, 3,8 a pH 4,5 e 5,5. À medida que se eleva o pH este valor de seletividade diminui, mas ainda mantém-se em torno de 3. Já para ampicilina /6-APA a resina apresentou um seletividade de 2,9 nos valores de pH 6,5 e 7,5, e essa seletividade diminui aproximadamente para metade deste valor nos valores de pH inferiores, 4,5 e 5,5. A seletividade com respeito a ampicilina /EMFG diminui quase três vezes com o aumento do pH, iniciando em 1,7 a pH 4,5 e diminuindo para 0,6 a pH 7,5.

Tabela 4.3- SELETIVIDADES DAS RESINAS XAD-4, XAD-7 E XAD-761 PARA AMPICILINA EM RELAÇÃO AO EMFG, 6-APA E FENILGLICINA EM VÁRIOS VALORES DE PH

XAD-4	pH				
	4,5	5,5	6,5	7,5	8,5
ampi /EMFG	2,2	1,8	1,2	0,9	0,8
ampi /fenilglicina	5,5	5,3	5,4	5,7	7,0
ampi /6-APA	3,3	3,8	4,0	4,6	4,4
XAD-7					
ampi/ EMFG	1,3	1,5	1,8	2,7	3,1
ampi /fenilglicina	4,5	4,1	3,0	2,3	1,9
ampi /6-APA	2,3	2,4	3,0	2,1	1,9
XAD-761					
ampi /EMFG	2,1	1,4	1,0	0,6	-
ampi /fenilglicina	3,8	3,8	3,3	2,9	-
ampi /6-APA	2,0	2,2	2,9	2,9	-

A maior seletividade alcançada pela resina XAD-4 para ampicilina /EMFG foi de 2,2 a pH 4,5. Já para ampicilina /fenilglicina o pH 8,5 apresentou o melhor resultado de seletividade, 7,0. No caso da seletividade ampicilina /6-APA a faixa de pH entre 6,5 e 8,5 apresenta os melhores valores, com uma discreta vantagem no pH 7,5.

Com os dados de eficiência de adsorção e seletividade pode-se verificar que a resina XAD-4 apresentou o melhor desempenho com respeito aos parâmetros avaliados. Contudo, tendo como avaliar qual resina apresentaria maior capacidade de adsorção de ampicilina, fenilglicina, EMFG e 6-APA, individualmente, optou-se por prosseguir os ensaios de determinação das isotermas de adsorção com as três resinas.

4.3 - ISOTERMAS DE ADSORÇÃO

A faixa de concentração dos compostos utilizada para determinação de suas isotermas de equilíbrio foi escolhida, conforme já mencionado anteriormente, levando-se em

consideração a solubilidade dos mesmos e suas concentrações estimadas no meio reacional. Os experimentos para discriminação do modelo cinético foram realizados na temperatura de 25° C e a pH 6,5, uma possível condição de trabalho no caso de processo integrado de reação e separação.

4.3.1 - ISOTERMAS DE EQUILÍBRIO UTILIZANDO RESINA AMBERLITE XAD-4

Os resultados experimentais utilizados na determinação da isoterma de equilíbrio para 6-APA utilizando resina XAD-4 são apresentados na Tabela 4.4.

Tabela 4.4- RESULTADOS EXPERIMENTAIS OBTIDOS NA DETERMINAÇÃO DA ISOTERMA DE EQUILÍBRIO PARA 6-APA UTILIZANDO RESINA XAD-4; PH 6,5.

Co (mg/mL)	C* (mg/mL)	q* (mg 6-APA/ g resina)
0	0	0
2,163	1,74582	8,34
4,326	3,435	18,01
6,489	5,18	26,29
8,652	6,95	33,97
10,815	8,65	43,34
15,141	10,32	53,2
17,304	12,15	59,89
19,467	13,74	71,28
21,63	15,53	78,76

A análise dos coeficientes de correlação apresentados na Tabela 4.5 demonstra que a isoterma Linear apresenta um ajuste significativamente melhor aos pontos experimentais do que as isotermas não lineares de Freundlich e Langmuir. Além disso, os valores dos parâmetros q_m e K_L obtidos mediante o ajuste do modelo de Langmuir não possuem significado físico. Sendo assim, pode-se concluir que a isoterma Linear é a que melhor representa a cinética de adsorção de 6-APA usando a resina XAD4. Uma vez que não ocorre considerável variação na eficiência de adsorção ao longo da faixa de pH estudada, o modelo linear deve representar satisfatoriamente a isoterma de adsorção em toda a faixa de pH. A Figura 4.8 mostra o ajuste do modelo escolhido, isoterma Linear, aos pontos experimentais.

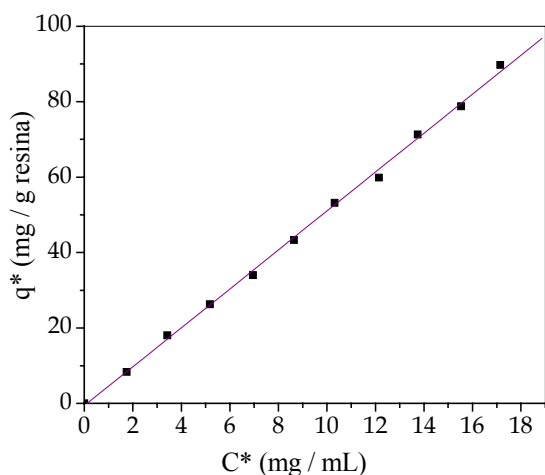


Figura 4.8 -ISOTERMA DE ADSORÇÃO DE 6-APA UTILIZANDO RESINA XAD-4, PH 6,5

Tabela 4.5- PARÂMETROS DE AJUSTE DOS MODELOS DE LANGMUIR, FREUNDLICH E LINEAR PARA O 6-APA E SEUS COEFICIENTES DE CORRELAÇÃO. RESINA XAD-4, PH 6,5.

Modelo de Langmuir para o 6-APA		
qm (mg/g)	K_L (mg/mL)	r^2
$3,37 \times 10^{15}$	$6,6 \times 10^{14}$	0,9983
Modelo de Freundlich para o 6-APA		
n	K_F (mL/mg resina)	r^2
1,03	4,7	0,9983
Modelo Linear para o 6-APA		
K_P (mL/mg resina)	r	
5,16	0,9992	

O resultados experimentais utilizados na determinação da isoterma de equilíbrio para EMFG em resina XAD-4, são apresentados na Tabela 4.6.

Tabela 4.6- RESULTADOS EXPERIMENTAIS OBTIDOS NA DETERMINAÇÃO DA ISOTERMA DE EQUILÍBRIO PARA EMFG UTILIZANDO RESINA XAD-4; PH 6,5.

C_o (mg/mL)	C^* (mg/mL)	q^* (mg EMFG/ g resina)
0	0	0
0,86	0,32	10,76
1,71	0,65	21,16
3,42	1,34	41,63
5,13	2,12	60,19
6,84	2,80	80,76
8,55	3,61	98,84
12,83	5,55	145,42
17,1	7,56	190,70
25,65	11,94	274,22
34,2	16,59	352,15

Como pode ser observado na Tabela 4.7, o ajuste do modelo linear conduziu a um coeficiente de correlação inferior aos obtidos para os modelos não lineares e foi por isso preterido. Desta forma, analisando-se valores de parâmetros e de coeficientes de correlação obtidos no ajuste dos modelos não lineares pode-se concluir que ambos representam bem a cinética de adsorção para o EMFG, na faixa de concentração analisada.

O pH influencia de forma significativa a eficiência de adsorção do EMFG. É possível, pois, que o modelo de Langmuir recaia no Linear a valores de pH menores, assim como uma discriminação bem mais clara possa ser obtida a valores de pH maiores. Contudo, o ajuste ligeiramente melhor do modelo de Langmuir, aliado a sua base teórica, recomenda a escolha desse modelo para representar a cinética de adsorção de EMFG na resina XAD-4.

A Figura 4.9 mostra o ajuste do modelo de Langmuir aos dados experimentais de adsorção do EMFG, obtidos com a resina XAD4 à 25° C e pH 6,5.

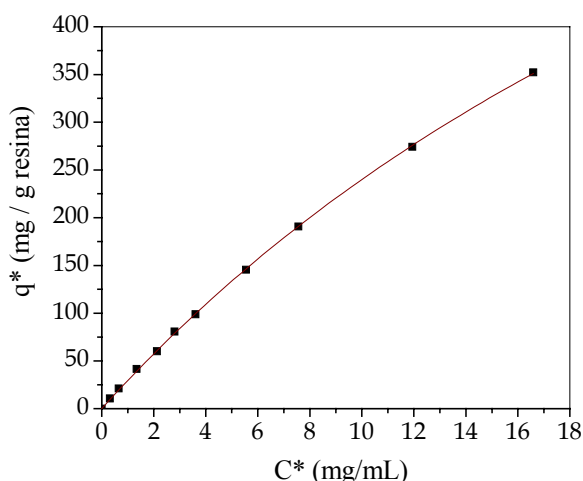


Figura 4.9 -ISOTERMA DE ADSORÇÃO DE EMFG UTILIZANDO RESINA XAD-4, pH 6,5

Tabela 4.7- PARÂMETROS DE AJUSTE DOS MODELOS DE LANGMUIR, FREUNDLICH E LINEAR PARA O EMFG E SEUS COEFICIENTES DE CORRELAÇÃO. RESINA XAD-4, PH 6,5.

Modelo de Langmuir para o EMFG		
qm (mg/g)	K _L (mg/mL)	r ²
1181	39,39	0,9998
Modelo de Freundlich para EMFG		
n	K _F (mL/mg resina)	r ²
0,83	34,4	0,9991
Modelo Linear para o EMFG		
K _P (mL/mg resina)	r	
21,41	0,9957	

Como pode ser observado na Tabela 4.3, o maior valor de seletividade ampicilina /EMFG alcançado pela resina XAD-4 foi a pH 4,5. Por este motivo, foi escolhido este como

um segundo valor de pH para avaliar o comportamento da isoterma de equilíbrio do EMFG e da fenilglicina. Esta segunda condição de pH só pode ser utilizada caso o sistema de operação síntese-purificação esteja desacoplado, pois o pH da reação está na faixa de 6,5 a 7,5. As isotermas da ampicilina e do 6-APA não foram determinadas a pH 4,5 devido aos baixos valores de solubilidade apresentados pelos compostos neste pH, como pode ser observado nas Figuras 4.1 e 4.2, apresentadas anteriormente.

Os resultados experimentais utilizados na determinação da isoterma de equilíbrio para EMFG a pH=4,5 utilizando resina XAD-4, são apresentados na Tabela 4.8.

Tabela 4.8- RESULTADOS EXPERIMENTAIS OBTIDOS NA DETERMINAÇÃO DA ISOTERMA DE EQUILÍBRIO PARA EMFG A pH=4,5 UTILIZANDO RESINA XAD-4

Co (mg/mL)	C* (mg/mL)	q* (mg EMFG/ g resina)
0	0	0
0,86	0,55	6,19
1,71	1,09	12,35
3,42	2,14	25,51
5,13	3,21	38,38
6,84	4,27	51,34
8,55	5,35	63,97
12,83	8,21	92,32
17,10	11,23	117,44
25,65	17,08	171,39
34,20	23,57	212,53

Assim como ocorreu para o EMFG no pH 6,5, a análise dos parâmetros e coeficientes de correlação apresentados na Tabela 4.9, mostrou que o ajuste do modelo Linear conduziu a um coeficiente de correlação, $r=0,9957$ inferior aos obtidos para os modelos não lineares. A partir dos valores de correlação obtidos no ajuste dos modelos não lineares, verifica-se que o modelo de Langmuir, $r^2 = 0,9995$, ajusta-se significativamente melhor aos dados experimentais do que o modelo de Freundlich, $r^2=0,9975$. Alia-se a isso, a base teórica apresentada pelo modelo de Langmuir. Desta maneira, foi escolhido este modelo para representar a cinética de adsorção de EMFG na resina XAD-4 a pH=4,5. A Figura 4.10 mostra o ajuste desse modelo aos pontos experimentais.

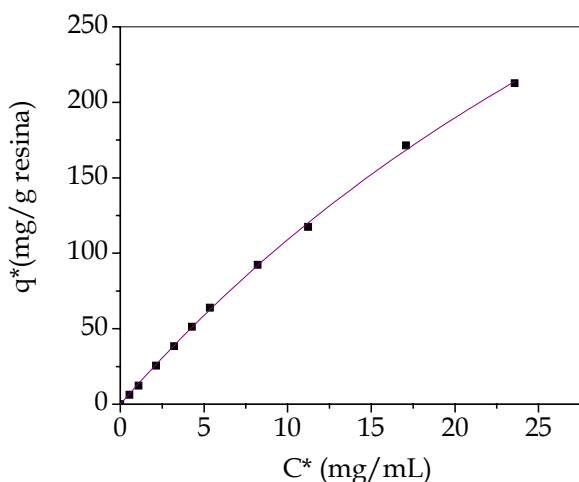


Figura 4.10 -ISOTERMA DE ADSORÇÃO DE EMFG UTILIZANDO RESINA XAD-4 , PH 4,5

Tabela 4.9- PARÂMETROS DE AJUSTE AOS MODELOS DE LANGMUIR, FREUNDLICH E LINEAR PARA EMFG, E SEUS COEFICIENTES DE CORRELAÇÃO. RESINA XAD-4, PH 4,5.

Modelo de Langmuir para o EMFG		
qm (mg/g)	K _L (mg/mL)	r ²
732,07	57,18	0,9995
Modelo de Freundlich para EMFG		
n	K _F (mL/mg resina)	r ²
0,84	15,26	0,9975
Modelo Linear para o EMFG		
K _P (mL/mg resina)	r	
21,41	0,9957	

O resultados experimentais utilizados na determinação da isoterma de equilíbrio para fenilglicina em resina XAD-4, são apresentados na Tabela 4.10.

Tabela 4.10- RESULTADOS EXPERIMENTAIS OBTIDOS NA DETERMINAÇÃO DA ISOTERMA DE EQUILÍBRIO PARA FENILGLICINA EM RESINA XAD-4 À PH 6,5.

Co (mg/mL)	C* (mg/mL)	q* (mg FG / g resina)
0	0	0
0,76	0,36	1,57
1,36	0,63	2,56
1,81	1,12	4,39
2,27	1,47	6,02
2,72	1,90	7,92
3,18	2,32	9,10
3,63	2,68	10,66
4,08	3,04	12,30
4,54	3,45	13,94

A análise dos parâmetros e coeficientes de correlação apresentados na Tabela 4.11, demonstra claramente que a isoterma Linear ajustou-se melhor aos pontos experimentais do que as isotermas não lineares de Freundlich e Langmuir. Apesar da correlação obtida pelo ajuste da isoterma de Langmuir (0,9989) estar muito próximo da correlação obtida pelo ajuste a isoterma de Freundlich (0,9986), os valores obtidos para os parâmetros q_m e K_L não possuem significado físico.

No caso do ajuste da isoterma de Freundlich, o valor de n , 0,99, mostra que esse modelo recai no modelo linear. Sendo assim, o modelo linear é realmente o que melhor representa o fenômeno. A pouca influência do pH na eficiência de adsorção da resina indica que a isoterma linear deve representar a adsorção de fenilglicina na resina XAD-4 ao longo da faixa de pH estudada neste trabalho. A Figura 4.11 mostra o ajuste ao modelo escolhido-Linear- à isoterma experimental de fenilglicina.

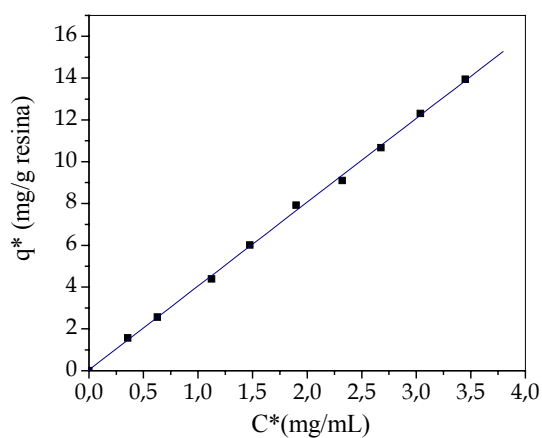


Figura 4.11 -ISOTERMAS DE ADSORÇÃO DE FG UTILIZANDO RESINA XAD-4, pH 6,5

Tabela 4.11- PARÂMETROS DE AJUSTE AOS MODELOS DE LANGMUIR, FREUNDLICH E LINEAR PARA FENILGLICINA E SEUS COEFICIENTES DE CORRELAÇÃO. RESINA XAD-4, pH 6,5.

Modelo de Langmuir para FG		
q_m (mg/g)	K_L (mg/mL)	r^2
7723	1914	0,9989
Modelo de Freundlich para FG		
n	K_F (mL/mg _{resina})	r^2
0,99	4,04	0,9986
Modelo Linear para FG		
K_P (mL/mg _{resina})	r	
4,01	0,9995	

O resultados experimentais utilizados na determinação da isoterma de equilíbrio à pH 4,5 para fenilglicina em resina XAD-4, são apresentados na Tabela 4.12.

Tabela 4.12- RESULTADOS EXPERIMENTAIS OBTIDOS NA DETERMINAÇÃO DA ISOTERMA DE EQUILÍBRIO PARA FENILGLICINA EM RESINA XAD-4 A pH=4,5.

Co (mg/mL)	C* (mg/mL)	q* (mg fenilglicina / g resina)
0	0	0
0,45	0,39	1,37
0,76	0,65	2,21
1,36	1,16	4,10
1,81	1,52	5,82
2,27	1,89	7,54
2,72	2,24	9,59
3,18	2,63	10,86
3,63	3,01	12,37
4,08	3,34	14,87
4,54	3,74	16,02

Comparando-se os resultados obtidos nos dois valores de pH, 4,5 e 6,5, pode-se verificar que as isotermas são bem parecidas, o que já era esperado devido a pouca influência do pH nas eficiências de adsorção da fenilglicina ao longo da faixa estudada. Como ocorrido no pH 6,5, a isoterma Linear ajustou-se melhor aos pontos experimentais, $r=0,9976$, do que as isotermas não Lineares de Freundlich $r^2= 0,9966$ e Langmuir $r^2=0,9922$. Comparando-se as constantes K_H nos valores de pH 4,5 e 6,5, pode-se notar que apresentam valores muito próximos, 4,4 mg/mL e 4,01 mg/mL, respectivamente. A Figura 4.12 mostra o ajuste ao modelo escolhido- Linear- à isoterma experimental de fenilglicina a pH 4,5.

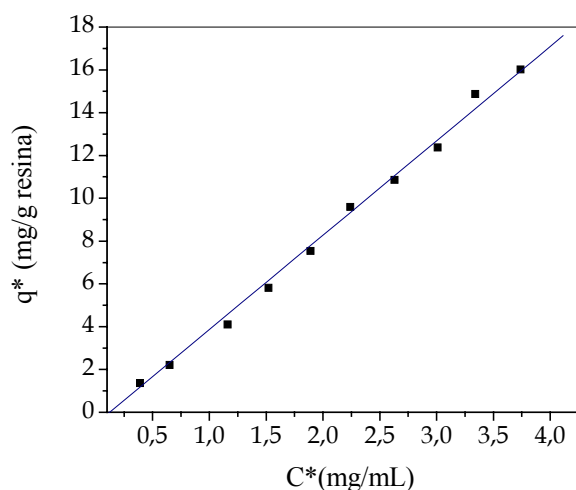


Figura 4.12 -ISOTERMAS DE ADSORÇÃO DE FG UTILIZANDO RESINA XAD-4., PH 4,5

Tabela 4.13- PARÂMETROS DE AJUSTE AOS MODELOS DE LANGMUIR, FREUNDLICH E LINEAR PARA FENILGLICINA, E SEUS COEFICIENTES DE CORRELAÇÃO. RESINA XAD-4 PH 4,5.

Modelo de Langmuir para FG		
qm (mg/g)	K_L (mg/mL)	r^2
$2,23 \times 10^{15}$	$5,24 \times 10^{14}$	0,9922
Modelo de Freundlich para FG		
n	K_F (mL/mg resina)	r^2
1,13	3,68	0,9966
Modelo Linear para FG		
K_P (mL/mg resina)		r
4,4		0,9976

O resultados experimentais utilizados na determinação da isoterma de equilíbrio para ampicilina, utilizando resina XAD-4, são apresentados na Tabela 4.14.

Tabela 4.14- RESULTADOS EXPERIMENTAIS OBTIDOS NA DETERMINAÇÃO DA ISOTERMA DE EQUILÍBRIO PARA AMPICILINA

C_o (mg/mL)	C^* (mg/mL)	q^* (mg ampi / g resina)
0	0	0
1,85	0,46	26,94
3,69	0,93	50,70
5,54	1,48	76,54
7,38	2,11	107,60
9,23	2,77	133,56
11,08	3,63	160,67
12,92	4,55	184,76
14,77	5,47	203,26
16,61	6,21	217,62
18,46	7,48	234,05

Assim como ocorreu para o EMFG, o ajuste do modelo Linear conduziu a um coeficiente de correlação inferior aos obtidos para os modelos não lineares. A partir dos valores de correlação obtidos no ajuste dos modelos não lineares para o caso da ampicilina, verifica-se que o modelo de Langmuir ajusta-se significativamente melhor aos dados experimentais do que o modelo de Freundlich. Aliado a isso, a base teórica apresentada pelo modelo de Langmuir. Desta maneira, foi escolhido este modelo para representar a cinética de adsorção de EMFG na resina XAD-4. A Figura 4.13 mostra o ajuste desse modelo aos pontos experimentais.

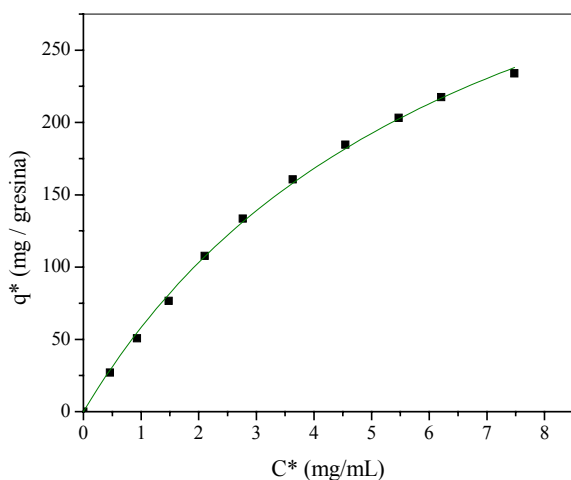


Figura 4.13 - ISOTERMA DE ADSORÇÃO DE ampi UTILIZANDO RESINA XAD-4

Tabela 4.15- PARÂMETROS DE AJUSTE AOS MODELOS DE LANGMUIR, FREUNDLICH E LINEAR PARA O AMPICILINA E SEUS COEFICIENTES DE CORRELAÇÃO. RESINA XAD-4, PH 6,5..

Modelo de Langmuir para o ampi		
q_m (mg/g)	K_L (mg/mL)	r^2
455,52	6,83	0,9988
Modelo de Freundlich para ampi		
n	K_F (mL/mg _{resina})	r^2
31,66	0,9766	31,66
Modelo Linear para ampi		
K_P (mL/mg _{resina})	r	
31,66	0,9766	

4.3.2 - ISOTERMAS DE EQUILÍBRIO UTILIZANDO RESINA AMBELITE XAD-7

A próxima resina a ser testada foi a Amberlite XAD-7, a isotermas dos compostos foram determinadas a pH 6,5 e 25°C e são apresentadas a seguir.

O resultados experimentais utilizados na determinação da isoterma de equilíbrio para 6-APA, em resina XAD-7, são apresentados na Tabela 4.16.

Tabela 4.16- RESULTADOS EXPERIMENTAIS OBTIDOS NA DETERMINAÇÃO DA ISOTERMA DE EQUILÍBRIO PARA 6-APA EM RESINA XAD-7

Co (mg/mL)	C* (mg/mL)	q* (mg 6-APA/ g resina)
0	0	0
2,16	2,16	4,13
4,33	4,33	8,64
6,49	6,49	13,50
8,65	8,65	18,30
10,82	10,82	22,80
12,98	12,98	27,65
15,14	15,14	32,38
17,30	17,30	38,34
19,47	19,47	42,41
21,63	21,63	47,64

A análise dos parâmetros e coeficientes de correlação apresentados na Tabela 4.17, demonstra que a isoterma Linear apresentou um ajuste mais adequado aos pontos experimentais do que as isotermas não lineares de Freundlich e Langmuir. Pode-se observar que, o ajuste da isoterma de Langmuir, $r^2=0,9989$ esta muito próximo das correlações obtidas pelo ajuste às isotermas de Freundlich, $r^2=0,9948$, e Linear, $r=0,9980$, porém, os valores obtidos para os parâmetros q_m e K_L não possuem significado físico. No caso do ajuste da isoterma de Freundlich, o valor de n obtido, 0,98, demonstra que esse modelo recai no modelo Linear. Por esta razão, o modelo Linear é realmente o que melhor representa o fenômeno. Assim como para a resina XAD-4, a pouca influência do pH na eficiência de adsorção da resina XAD-7, indica que a isoterma linear pode representar a adsorção de 6-APA nesta resina ao longo de toda faixa de pH estudada. A Figura 4.14 mostra o ajuste ao modelo escolhido-Linear- à isoterma experimental de 6-APA.

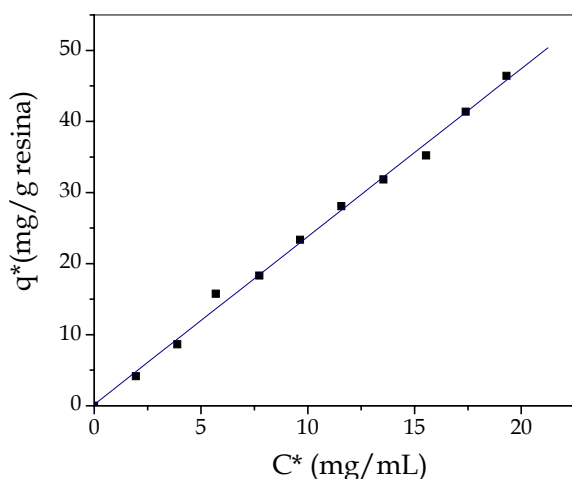


Figura 4.14 -ISOTERMA DE ADSORÇÃO DE 6-APA UTILIZANDO RESINA XAD-7, pH 6,5

Tabela 4.17- PARÂMETROS DE AJUSTE AOS MODELOS DE LANGMUIR, FREUNDLICH E LINEAR PARA 6-APA E SEUS COEFICIENTES DE CORRELAÇÃO. RESINA XAD-7, pH 6,5.

Modelo de Langmuir para 6-APA		
qm (mg/g)	K _L (mg/mL)	r ²
1570	646	0,9961
Modelo de Freundlich para 6-APA		
n	K _F (mL/mg resina)	r ²
0,98	2,51	0,9948
Modelo Linear para 6-APA		
K _P (mL/mg resina)	r	
2,36	0,9980	

O resultados experimentais utilizados na determinação da isoterma de equilíbrio para ampicilina à pH 6,5 utilizando resina XAD-7, são apresentados na Tabela 4.18.

Tabela 4.18- RESULTADOS EXPERIMENTAIS OBTIDOS NA DETERMINAÇÃO DA ISOTERMA DE EQUILÍBRIO PARA AMPICILINA EM RESINA XAD-7 E pH 6,5.

Co (mg/mL)	C* (mg/mL)	q* (mg ampicilina / g resina)
0	0	0
1,85	1,26	11,79
5,54	3,42	42,45
7,38	4,51	57,51
9,23	5,76	69,32
11,08	6,99	81,80
12,92	8,16	95,14
14,77	9,25	110,42
16,61	10,43	123,76
18,46	11,61	136,93

A análise dos parâmetros e coeficientes de correlação apresentados na Tabela 4.19, demonstra claramente que a isoterma Linear, $r=0,9991$, ajustou-se melhor aos pontos experimentais do que as isotermas não lineares de Freundlich e Langmuir. Apesar da correlação obtida pelo ajuste da isoterma de Langmuir, $r^2=0,9981$, apresentar um valor ligeiramente melhor de correlação do que o valor obtido no ajuste à isoterma de Freundlich, $r^2=0,9975$, deve-se observar que os valores dos parâmetros q_m e K_L obtidos para modelo de Langmuir, não possuem significado físico, e desta forma este modelo é inaceitável. Diferente do 6-APA, o pH possui uma considerável influência sobre a eficiência de adsorção da resina, o que indica que a isoterma linear pode não representar de forma satisfatória a adsorção de ampicilina na resina XAD-7 ao longo de toda faixa de pH estudada. A Figura 4.15 mostra o ajuste ao modelo escolhido -Linear- à isoterma experimental de ampicilina.

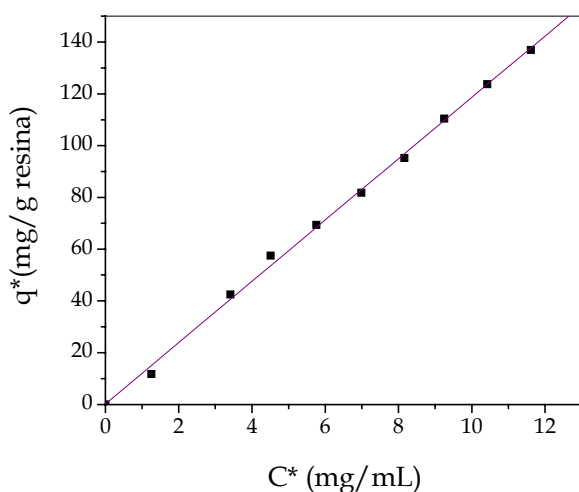


Figura 4.15 -ISOTERMA DE ADSORÇÃO DE AMPI UTILIZANDO RESINA XAD-7, pH 6,5

Tabela 4.19- PARÂMETROS DE AJUSTE AOS MODELOS DE LANGMUIR, FREUNDLICH E LINEAR PARA O AMPICILINA, E SEUS COEFICIENTES DE CORRELAÇÃO. RESINA XAD-7, pH 6,5

Modelo de Langmuir para ampi		
q_m (mg/g)	K_L (mg/mL)	r^2
$1,66 \times 10^{15}$	$1,4 \times 10^{14}$	0,9981
Modelo de Freundlich para ampi		
n	K_F (mL/mg resina)	r^2
0,98	12,44	0,9975
Modelo Linear para ampi		
K_P (mL/mg resina)	r	
11,84	0,9991	

O resultados experimentais utilizados na determinação da isoterma de equilíbrio para EMFG utilizando resina XAD-7, são apresentados na Tabela 4.20.

Tabela 4.20- RESULTADOS EXPERIMENTAIS OBTIDOS NA DETERMINAÇÃO DA ISOTERMA DE EQUILÍBRIO PARA EMFG EM RESINA XAD-7 E PH 6,5.

Co (mg/mL)	C* (mg/mL)	q* (mg EMFG/ g resina)
0	0	0
0,86	0,39	9,34
1,71	0,93	15,69
3,42	2,01	28,17
5,13	3,18	39,01
6,84	4,36	49,60
8,55	5,42	62,70
12,83	8,49	86,78
17,10	11,67	108,54
25,65	17,71	158,74
34,20	24,08	202,40

Pode-se observar na Tabela 4.21, que o ajuste do modelo Linear conduziu a um coeficiente de correlação inferior aos obtidos para os modelos não lineares e assim, este foi preterido. Ao analisarmos os valores de correlação obtidos no ajuste dos modelos não lineares para o caso do EMFG, podemos notar que o modelo de Langmuir apresentou uma correlação muito próxima ao modelo Linear, $r^2=0,9965$ e $r=0,9964$, respectivamente. Ambas correlações são significativamente inferiores a obtida pelo ajuste ao modelo de Freundlich, $r^2=0,9992$. Logo, pode-se concluir que o modelo de Freundlich é o que melhor se ajusta aos dados experimentais e por isso, foi escolhido para representar a cinética de adsorção de EMFG na resina XAD-7. Como mostrado na Figura 4.6, o pH possui uma leve influência sobre a eficiência de adsorção do EMFG na faixa de pH utilizada neste trabalho. Desta forma, pode ser que a isoterma de Freundlich não venha a representar satisfatoriamente a adsorção do EMFG em toda a faixa estudada. A Figura 4.16 mostra o ajuste desse modelo aos pontos experimentais.

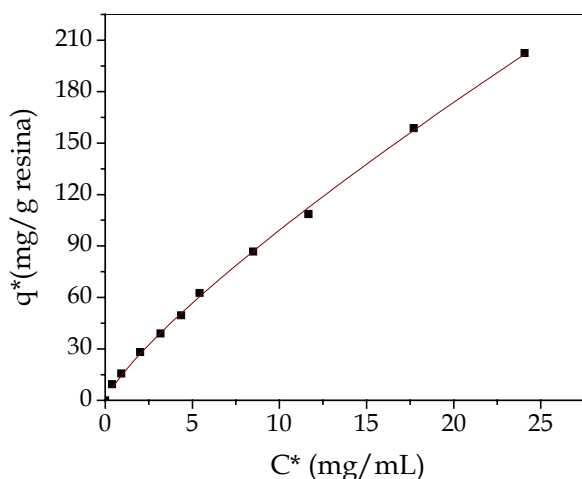


Figura 4.16 -ISOTERMA DE ADSORÇÃO DE EMFG UTILIZANDO RESINA XAD-7, PH 6,5

Tabela 4.21- PARÂMETROS DE AJUSTE AOS MODELOS DE LANGMUIR, FREUNDLICH E LINEAR PARA O EMFG, E SEUS COEFICIENTES DE CORRELAÇÃO. RESINA XAD-7, PH 6,5.

Modelo de Langmuir para o EMFG		
qm (mg/g)	K _L (mg/mL)	r ²
639,26	53,05	0,9965
Modelo de Freundlich para o EMFG		
n	K _F (mL/mg resina)	r ²
0,81	15,45	0,9992
Modelo Linear para o EMFG		
K _p (mL/mg resina)	r	
8,26	0,9964	

O resultados experimentais utilizados na determinação da isoterma de equilíbrio para fenilglicina à pH 6,5 e utilizando resina XAD-7, são apresentados na Tabela 4.22.

Tabela 4.22- RESULTADOS EXPERIMENTAIS OBTIDOS NA DETERMINAÇÃO DA ISOTERMA DE EQUILÍBRIO PARA FENILGLICINA UTILIZANDO RESINA XAD-7 E PH 6,5.

Co (mg/mL)	C* (mg/mL)	q* (mg FG / g resina)
0	0	0
0,53	0,46	1,31
0,91	0,81	1,93
1,36	1,23	2,69
1,81	1,62	3,92
2,27	2,03	4,81
2,72	2,42	6,12
3,18	2,83	6,89
3,63	3,23	8,03
4,08	3,62	9,17
4,54	4,02	10,32

A análise dos parâmetros e coeficientes de correlação apresentados na Tabela 4.23, demonstra que a isoterma Linear ajustou-se ligeiramente melhor aos pontos experimentais do que as isotermas não lineares de Freundlich e Langmuir. Deve ser ressaltado que os valores obtidos para os parâmetros q_m , $-2,39 \times 10^{13}$ e K_L , $-1,17 \times 10^{13}$ não possuem qualquer significado físico e por esse motivo este modelo foi descartado. No caso do ajuste à isoterma de Freundlich, o valor de n , 1,05, mostra que esse modelo recai no modelo linear. Sendo assim, o modelo linear é realmente o que melhor representa o fenômeno. Devido a pouca influência do pH na eficiência de adsorção da resina XAD-7, ver Figura 4.6, é provável que o modelo de isoterma Linear represente de forma satisfatória a adsorção de fenilglicina na resina XAD-7 ao longo de toda faixa de pH avaliada. A Figura 4.17 mostra o ajuste ao modelo escolhido -Linear- à isoterma experimental de fenilglicina .

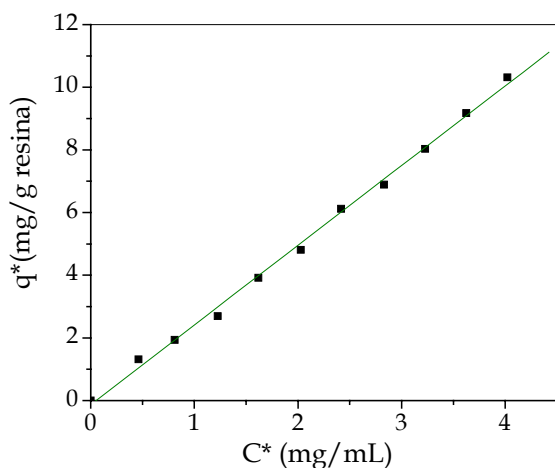


Figura 4.17 -ISOTERMA DE ADSORÇÃO DE FG UTILIZANDO RESINA XAD-7, PH 6,5

Tabela 4.23- PARÂMETROS DE AJUSTE AOS MODELOS DE LANGMUIR, FREUNDLICH E LINEAR PARA FG E SEUS COEFICIENTES DE CORRELAÇÃO. RESINA XAD-7, PH 6,5.

Modelo de Langmuir para FG		
q_m (mg/g)	K_L (mg/mL)	r^2
$-2,39 \times 10^{13}$	$-1,17 \times 10^{13}$	0,9967
Modelo de Freundlich para FG		
n	K_F (mL/mg resina)	r^2
1,05	2,34	0,9968
Modelo Linear para FG		
K_P (mL/mg resina)	r	
2,53	0,9986	

4.3.3 - ISOTERMAS DE EQUILÍBRIO UTILIZANDO RESINA DUOLITE XAD-761

A terceira e última resina a ser testada foi a Duolite XAD-761, as isotermas dos compostos foram determinadas a pH 6,5 e 25° C são apresentadas a seguir.

O resultados experimentais utilizados na determinação da isoterma de equilíbrio para 6-APA à pH 6,5 utilizando resina XAD-761, são apresentados na Tabela 4.24.

Tabela 4.24- RESULTADOS EXPERIMENTAIS OBTIDOS NA DETERMINAÇÃO DA ISOTERMA DE EQUILÍBRIO PARA 6-APA EM RESINA XAD-761 E PH 6,5.

Co (mg/mL)	C* (mg/mL)	q* (mg 6-APA/ g resina)
0	0	0
2,16	1,79	7,53
4,33	3,60	14,46
6,49	5,46	20,58
8,65	7,32	26,61
10,82	9,09	34,60
12,98	11,00	39,63
15,14	12,93	44,13
17,30	14,86	48,79
19,47	16,82	52,86
21,63	18,75	57,65

Pode-se observar na Tabela 4.25, que o ajuste do modelo Linear conduziu a um coeficiente de correlação, $r=0,9935$, inferior aos obtidos para os modelos não lineares de Langmuir e Freundlich, $r^2=0,9986$ e $r^2=0,995$, respectivamente e por isso foi descartado. A partir dos valores de correlação obtidos no ajuste dos modelos não lineares, verifica-se que o modelo de Langmuir ajusta-se um pouco melhor aos dados experimentais do que o modelo de Freundlich e aliado a sua base teórica, recomendam a escolha desse modelo para representar a cinética de adsorção de 6-APA utilizando a resina XAD-761.

Devido a considerável influência do pH, abaixo de 6,5, sobre as eficiências de adsorção de 6-APA na resina XAD-761, ver Figura 4.7, é possível que o modelo escolhido não represente satisfatoriamente o equilíbrio nestes valores de pH. Por outro lado, parece provável que nos valores de pH acima de 6,5 o modelo escolhido venha a descrever de forma satisfatória a cinética de adsorção de 6-APA na resina XAD-761. A Figura 4.18 mostra o ajuste do modelo escolhido, Langmuir, aos pontos experimentais.

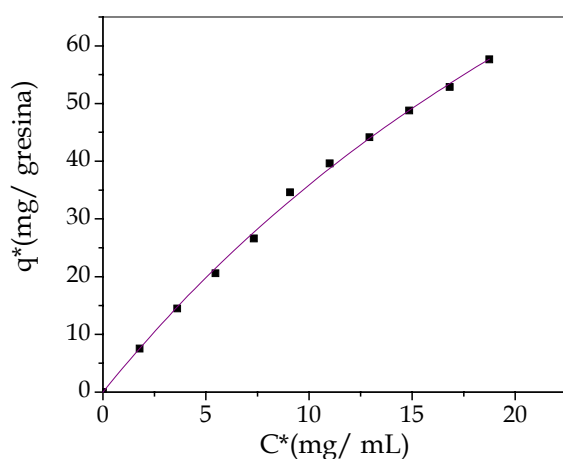


Figura 4.18 -ISOTERMA DE ADSORÇÃO DE 6-APA UTILIZANDO RESINA XAD-761, PH 6,5

Tabela 4.25- PARÂMETROS DE AJUSTE AOS MODELOS DE LANGMUIR, FREUNDLICH E LINEAR PARA 6-APA E SEUS COEFICIENTES DE CORRELAÇÃO. RESINA XAD-761, PH 6,5.

Modelo de Langmuir para o 6-APA		
qm (mg/g)	K _L (mg/mL)	r ²
188,95	42,05	0,9986
Modelo de Freundlich para o 6-APA		
n	K _F (mL/mg resina)	r ²
0,82	5,42	0,9951
Modelo Linear para o 6-APA		
K _P (mL/mg resina)	r	
3,06	0,9935	

O resultados experimentais utilizados na determinação da isoterma de equilíbrio para ampicilina a pH 6,5 e utilizando resina XAD-761, são apresentados na Tabela 4.26.

Tabela 4.26- RESULTADOS EXPERIMENTAIS OBTIDOS NA DETERMINAÇÃO DA ISOTERMA DE EQUILÍBRIO PARA AMPICILINA EM RESINA XAD-7 E PH 6,5.

Co (mg/mL)	C* (mg/mL)	q* (mg ampicilina / g resina)
0	0	0
1,82	0,93	17,73
3,64	2,02	32,49
5,46	3,17	45,79
7,28	4,38	58,19
9,11	5,72	67,69
10,93	7,11	76,34
12,75	8,45	85,89
14,57	9,80	95,30
16,39	11,20	103,75
18,21	12,58	112,61

Pode-se observar na Tabela 4.27, que o ajuste do modelo Linear conduziu a um coeficiente de correlação muito inferior aos ajustes obtidos para os modelos não lineares e assim este foi preterido. Ao analisarmos os valores de correlação obtidos no ajuste dos modelos não lineares para o caso do EMFG, podemos notar que ambos modelos de Langmuir e Freundlich apresentaram boas correlações e ainda, de valores semelhantes, $r^2=0,9970$ e $r=0,9984$, respectivamente. Aparentemente o modelo de Freundlich é o que melhor se ajusta aos dados experimentais e por isso, foi escolhido para representar a cinética de adsorção da ampicilina na resina XAD-761. Como mostrado na Figura 4.7, o pH possui influência sobre a eficiência de adsorção de ampicilina na faixa de pH utilizada. Desta forma, pode ser que a isoterma de Freundlich não venha a representar satisfatoriamente a adsorção de ampicilina em toda faixa. A Figura 4.19 mostra o ajuste deste modelo aos pontos experimentais.

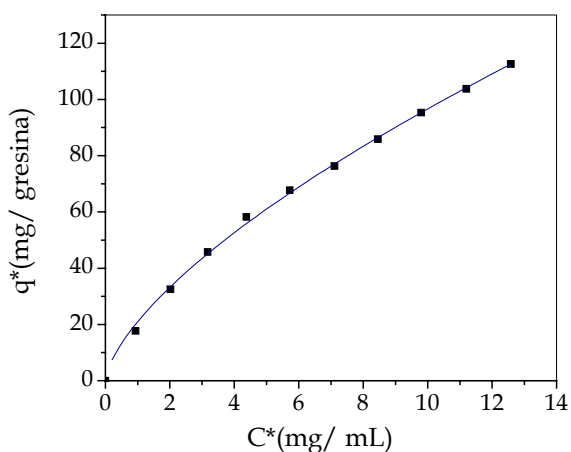


Figura 4.19 -ISOTERMA DE ADSORÇÃO DE AMPI UTILIZANDO RESINA XAD-761, pH 6,5.

Tabela 4.27- PARÂMETROS DE AJUSTE AOS MODELOS DE LANGMUIR, FREUNDLICH E LINEAR PARA O ampi E SEUS COEFICIENTES DE CORRELAÇÃO. RESINA XAD-761.PH 6,5.

Modelo de Langmuir para ampi		
qm (mg/g)	K_L (mg/mL)	r^2
216,26	12,26	0,9970
Modelo de Freundlich para ampi		
n	K_F (mL/mg resina)	r^2
0,66	20,96	0,9984
Modelo Linear para ampi		
K_P (mL/mg resina)	r	
8,41	0,9846	

O resultados experimentais utilizados na determinação da isoterma de equilíbrio para EMFG a pH 6,5 e utilizando resina XAD-761, são apresentados na Tabela 4.28.

Tabela 4.28- RESULTADOS EXPERIMENTAIS OBTIDOS NA DETERMINAÇÃO DA ISOTERMA DE EQUILÍBRIO PARA EMFG EM RESINA XAD-761 E PH 6,5.

Co (mg/mL)	C* (mg/mL)	q* (mg EMFG/ g resina)
0	0	0
0,86	0,43	8,52
1,71	0,78	18,52
3,42	1,58	36,74
5,13	2,38	54,94
6,84	3,12	74,50
8,55	3,98	91,44
12,83	6,14	133,80
17,10	8,80	165,93
25,65	13,99	233,10
34,20	20,14	281,22

Como pode ser observado na Tabela 4.29, o ajuste do modelo linear conduziu a um coeficiente de correlação, $r=0,9817$, muito inferior aos obtidos para os modelos não lineares de Freundlich e Langmuir, $r^2=0,9915$ e $r^2=0,9992$. Analisando-se os valores de parâmetros e de coeficientes de correlação obtidos aos ajustes dos modelos não lineares pode-se observar que o modelo de Langmuir apresentou correlação consideravelmente superior àquela obtido pelo modelo de Freundlich. Por esta razão é possível afirmar que o modelo de Langmuir representa a cinética de adsorção para o EMFG em resina XAD-761, na faixa de concentração analisada. O pH influencia sensivelmente na eficiência de adsorção de EMFG, conforme foi mostrado na Figura 4.7 e assim, é possível que o modelo de Langmuir recaia no Linear a valores de pH menores, e ainda uma discriminação bem mais clara possa ser obtida a valores de pH maiores. A Figura 4.20 mostra o ajuste ao modelo escolhido –Langmuir– à isoterma experimental do EMFG utilizando a resina XAD-761.

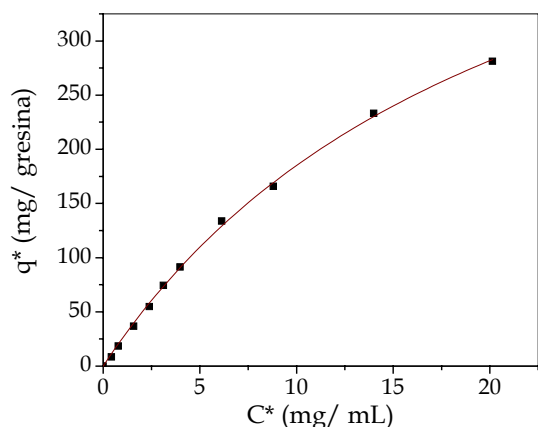


Figura 4.20 -ISOTERMA DE ADSORÇÃO DE EMFG UTILIZANDO RESINA XAD-761, PH 6,5

Tabela 4.29- PARÂMETROS DE AJUSTE AOS MODELOS DE LANGMUIR, FREUNDLICH E LINEAR PARA O EMFG, E SEUS COEFICIENTES DE CORRELAÇÃO.

Modelo de Langmuir para o EMFG

qm (mg/g)	K_L (mg/mL)	r^2
590,20	21,89	0,9992

Modelo de Freundlich para o EMFG

n	K_F (mL/mg resina)	r^2
0,73	37,73	0,9915

Modelo Linear para o EMFG

K_P (mL/mg resina)	r
14,38	0,9817

Os resultados experimentais utilizados na determinação da isoterma de equilíbrio para EMFG a pH=4,5 utilizando resina XAD-761, são apresentados na Tabela 4.30.

Tabela 4.30- RESULTADOS EXPERIMENTAIS OBTIDOS NA DETERMINAÇÃO DA ISOTERMA DE EQUILÍBRIO PARA EMFG A PH=4,5 UTILIZANDO RESINA XAD-761

C_o (mg/mL)	C^* (mg/mL)	q^* (mg EMFG/ g resina)
0	0	0
0,86	0,62	4,72
1,71	1,23	9,59
3,42	2,60	16,30
5,13	3,83	26,05
6,84	5,14	33,98
8,55	6,37	43,52
12,83	9,77	61,16
17,10	13,27	76,54
25,65	19,86	115,78
30,78	23,78	139,97
34,20	26,53	153,40

A análise dos parâmetros e coeficientes de correlação apresentados na Tabela 4.31 demonstra que a isoterma Linear, $r=0,9992$, apresentou um ajuste mais adequado aos pontos experimentais do que as isotermas não lineares de Freundlich, $r^2=0,9989$, e Langmuir, $r^2=0,9986$. É possível notar que diferente do resultado encontrado utilizando pH 6,5, no qual o modelo de Langmuir apresentou melhor ajuste aos pontos experimentais, no pH 4,5 o modelo Linear foi de melhor ajuste. Isto pode ser explicado devido a queda na eficiência de adsorção apresentada pelo EMFG com a diminuição do pH, ver Figura 4.7 e desta forma, fez com que a isoterma de Langmuir recaísse numa isoterma Linear. A Figura 4.21 mostra o ajuste ao modelo escolhido- Linear- à isoterma experimental de EMFG a pH 4,5.

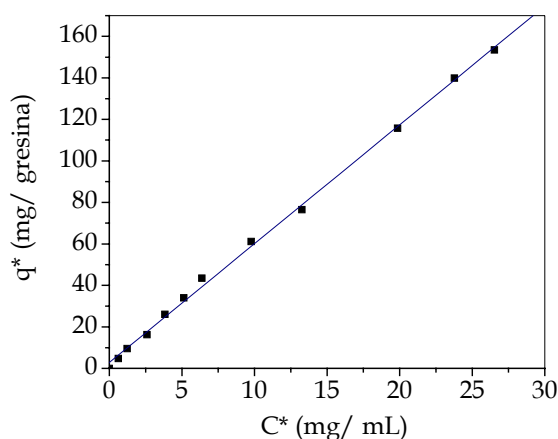


Figura 4.21 -ISOTERMA DE ADSORÇÃO DE EMFG EM RESINA XAD-761; PH 4,5

Tabela 4.31- PARÂMETROS DE AJUSTE AOS MODELOS DE LANGMUIR, FREUNDLICH E LINEAR PARA O EMFG, E SEUS COEFICIENTES DE CORRELAÇÃO. RESINA XAD-761, PH 4,5.

Modelo de Langmuir para o EMFG		
q_m (mg/g)	K_L (mg/mL)	r^2
1342	206	0,9986
Modelo de Freundlich para o EMFG		
n	K_F (mL/mg resina)	r^2
0,93	7,79	0,9989
Modelo Linear para o EMFG		
K_P (mL/mg resina)	r	
5,73	0,9992	

Os resultados experimentais utilizados na determinação da isoterma de equilíbrio para fenilglicina a pH 6,5 e utilizando resina XAD-761, são apresentados na Tabela 4.32.

Tabela 4.32- RESULTADOS EXPERIMENTAIS OBTIDOS NA DETERMINAÇÃO DA ISOTERMA DE EQUILÍBRIO PARA FENILGLICINA UTILIZANDO RESINA XAD-761 E PH 6,5.

Co (mg/mL)	C* (mg/mL)	q* (mg FG / g resina)
0	0	0
0,53	0,53	1,46
0,91	0,77	2,68
1,36	1,16	4,01
1,81	1,55	5,32
2,27	1,90	7,29
2,72	2,25	9,42
3,18	2,64	10,73
3,63	3,01	12,36
4,08	3,38	14,13
4,54	3,75	15,77

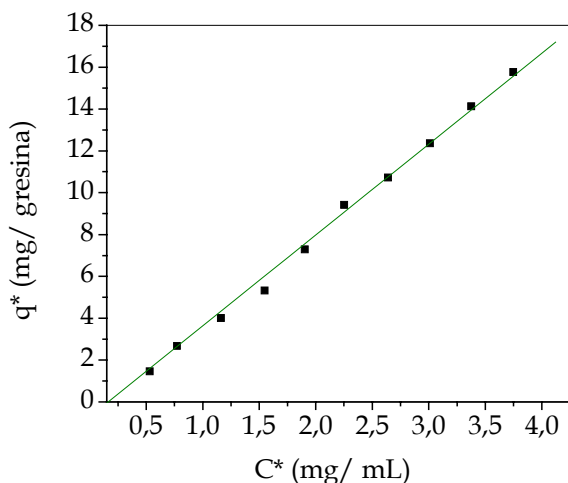


Figura 4.22 -ISOTERMA DE ADSORÇÃO DE FG UTILIZANDO RESINA XAD-761, PH 6,5

Tabela 4.33- PARÂMETROS DE AJUSTE AOS MODELOS DE LANGMUIR, FREUNDLICH E LINEAR PARA FG, E SEUS COEFICIENTES DE CORRELAÇÃO. RESINA XAD-761, PH 6,5.

Modelo de Langmuir para FG		
qm (mg/g)	K _L (mg/mL)	r ²
4,42X10 ¹⁵	1.09X10 ¹⁵	0,9898
Modelo de Freundlich para FG		
n	K _F (mL/mg resina)	r ²
1,16	3,46	0,9972
Modelo Linear para FG		
K _P (mL/mg resina)	r	
4,35	0,9976	

A análise dos parâmetros e coeficientes de correlação apresentados na Tabela 4.33, demonstra que a isoterma Linear, $r=0,9976$, ajustou-se ligeiramente melhor aos pontos experimentais do que a isoterma não lineares de Freundlich, $r^2=0,9976$ e muito melhor do que a isoterma de Langmuir, $r^2=0,9898$. O ajuste a esta última conduziu a valores dos parâmetros q_m , e K_L que não possuem qualquer significado físico. Devido a pouca influência do pH na eficiência de adsorção de fenilglicina na resina XAD-761, ver Figura 4.7, é provável que o modelo de isoterma Linear represente de forma satisfatória a adsorção de fenilglicina nesta resina ao longo de toda faixa de pH avaliada. A Figura 4.22 mostra o ajuste ao modelo escolhido -Linear- à isoterma experimental de fenilglicina .

Definido como objetivo global a separação e/ou concentração de ampicilina a partir de uma mistura que contenha fenilglicina, optou-se por continuar o trabalho com a resina XAD-4. Esta forneceu os melhores valores de seletividade ampi/FG entre todas as resinas. Além disso, a resina XAD-4 foi a que apresentou o maior valor de capacidade de adsorção de ampicilina, mostrada na Tabela 4.15. É importante lembrar que as resinas XAD-7 e XAD-761 foram preteridas nas condições dos ensaios realizados e devido a necessidade de seguir o trabalho com apenas uma resina, ou seja, estas resinas não deveriam ser descartadas de forma definitiva do estudo de separação e/ou concentração de ampicilina e fenilglicina, principalmente a resina XAD-761 que apresentou bons valores de eficiência de adsorção.

Os resultados obtidos para a variação da eficiência de adsorção com o pH demonstraram que este parâmetro pode ser muito útil na separação ou concentração dos compostos, pois principalmente para a ampicilina, a variação da capacidade de adsorção da resina XAD-4 varia consideravelmente. Porém, neste trabalho foi definido que o pH da reação, 6,5, seria o utilizado nos ensaios seguintes, isto porque, a falta de informação na literatur,a sobre o uso de resinas hidrofóbicas para separação de ampicilina e fenilglicina, não permite que se possa realizar ensaios testando todas as variáveis possíveis. Mesmo que fosse utilizada uma faixa restrita de pH, o número de experimentos necessários poderia inviabilizar o término do trabalho no prazo previsto.

4.4 - ENSAIOS EM COLUNA

4.4.1 - DETERMINAÇÃO DA POROSIDADE DO LEITO E COEFICIENTES DE PARTIÇÃO COLUNA K9/15

De acordo com a Equação (3.29) apresentada no Capítulo 3, calculou-se os tempos de retenção que foram 3,58 min. para fenilglicina e 3,90 min para ampicilina. Todos ensaios foram realizados a 25°C e com diâmetro de partícula 0,033cm previamente selecionados. O gráfico de $(L/t_R) \times v_0$ foi construído de acordo com a Equação (3.29) e está representado pela Figura 4.23. Como explicado anteriormente, a porosidade do leito foi determinada a partir da inclinação da reta obtida para os pulsos de NaCl, associada com este gráfico. O coeficiente de correlação para a reta relacionada ao NaCl é $R=0,9998$ e está apresentado no gráfico. Utilizando a Equação (3.29) obtém-se um valor de porosidade do leito (ϵ) de 0,33.

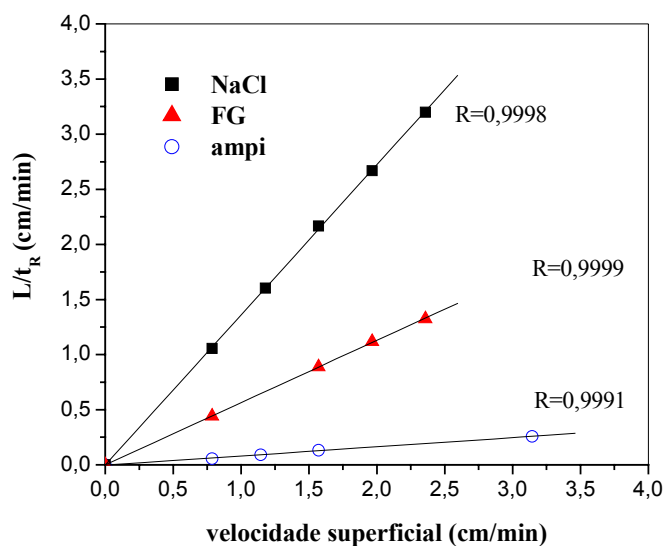


Figura 4.23 - L/T_R X VELOCIDADE SUPERFICIAL

As constantes de adsorção foram determinadas usando um procedimento similar. Neste caso a Equação (3.30) foi utilizada ao invés da Equação (3.29). Os resultados dos tempos de retenção estão apresentados na Figura 4.23. Os coeficientes de correlação estão apresentados no gráfico sendo $R=0,9991$ e $0,9999$ para ampicilina e fenilglicina, respectivamente. Os coeficientes de partição calculados foram $k_p=3,91$ para fenilglicina e $k_p=44,17$ para ampicilina.

Ambos valores de k_p para ampicilina e fenilglicina, obtidos pela análise de momento, guardam grande semelhança aos obtidos nos ensaios de determinação de suas isotermas. Para

fenilglicina o valor obtido nos ensaios em batelada foi 4,01. Para ampicilina não se pode fazer esta comparação diretamente, mas ao admitir-se que a concentração de 5mM ou 1,78 mg/mL está no início da faixa de estudo da isoterma e constituindo uma reta até a concentração de 2,76 mg/mL obtém-se uma isoterma linear com coeficiente de correlação $R=0,9958$. Esta aproximação conduz a um valor de $k_p= 47,71$ mg/mL, bem próximo do valor obtido pela análise de momento dos ensaios em coluna, $k_p= 44,17$.

4.4.2 - DETERMINAÇÃO DOS COEFICIENTES DE TRANSFERÊNCIA DE MASSA.

Após o cálculos dos valores dos coeficientes de transferência no filme para ampicilina e fenilglicina, usando a Equação (3.28), pode-se determinar a altura do prato teórico corrigido ($HETP_{\text{corrigido}}$) e utilizando-se a Equação (3.25) e construindo o gráfico $HETP_{\text{corrigido}} \times v$ como mostra a Figura 4.24.

Os coeficientes de correlação para as três retas são apresentados no gráfico sendo $R=0,9825$, $R=0,9958$ e $R=0,9996$ para NaCl, fenilglicina e ampicilina, respectivamente. A partir das inclinações das curvas e de seus pontos de intersecção, pode-se determinar os coeficientes de difusão e de dispersão axial independentemente e estes valores estão apresentados na Tabela 4.34.

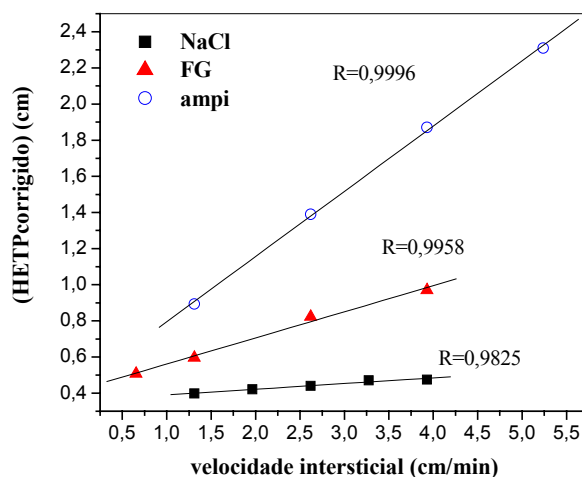


Figura 4.24 -ALTURA DO PRATO TEÓRICO CORRIGIDO X VELOCIDADE INTERSTICIAL

Tabela 4.34- COMPARAÇÃO DOS VALORES DE DP E EB EXPERIMENTAIS E CALCULADOS

		NaCl	Ampicilina	Fenilglicina
α		0,0312	0,361	0,145
β		0,360	0,434	0,416
E_b (cm ² /min)		0,180v	0,217v	0,208v
D_p (10 ⁴ m ² /min)	Experimentos	2,885	0,781	1,407
	Equação (3.31)	2,816	0,790	1,345

4.4.3 - INFLUÊNCIA DO DIÂMETRO DA PARTÍCULA NA RESOLUÇÃO DAS CURVAS DE ELUIÇÃO.

Os ensaios para avaliação da influência do diâmetro da partícula na separação de ampicilina e fenilglicina foram realizados variando-se a vazão e comparando-se os efeitos desta variação sobre a resolução dos picos, todos ensaios realizados a temperatura de 25°C. As Figuras 4.25, 4.26, 4.27, apresentadas neste item foram construídas fazendo com que o eixo das ordenadas seja uma relação entre as concentrações ao longo do experimento e a concentração máxima atingida no ensaio. Este artifício teve como objetivo impedir que variações na concentração das amostras dos pulsos e dos volumes injetados interferissem na avaliação dos resultados das curvas obtidas.

Os ensaios para avaliação da influência do diâmetro da partícula e da temperatura nas curvas de eluição foram realizados apenas utilizando-se a fenilglicina. Este procedimento teve por objetivo avaliar os parâmetros com relação ao composto que apresentava menor afinidade pela resina e por esse motivo possuía menores tempos de retenção, ao que conduzia a corridas mais rápidas. Presume-se que a influência do diâmetro da partícula e temperatura deve ser semelhante para ambos compostos, talvez com um efeito maior para um do que para outro, não existe, aparentemente, nenhum motivo para que ocorram comportamentos opostos para ampicilina e fenilglicina quando ocorra a variação de um destes parâmetros.

Desta forma optou-se por utilizar apenas a fenilglicina nestes ensaios iniciais onde o objetivo era escolher o diâmetro da partícula e verificar se havia influência, significativa, da temperatura nas curvas de eluição do composto.

As Figuras 4.25 e 4.26 apresentam os resultados das injeções de fenilglicina, em pulso, obtidos variando-se a vazão de 0,25 a 2,0 mL/min utilizando-se dois diâmetros médios de partícula, 0,033cm e 0,06cm. As linhas cheias nos gráficos representam o ajuste de uma curva de Gauss aos dados experimentais, esta curva é característica de sistemas cromatográficos.

Nesta etapa da discussão dos resultados, será utilizada a Equação de Van Deemter, (3.31). A utilização desta equação auxiliará na discussão dos resultados obtidos de maneira que parece interessante lembrar a forma em que esta foi apresentada no Capítulo anterior, bem como relembrar a definição dos parâmetros que compõe esta equação. A Equação de Van Deemter apresentada no Capítulo 3 segue a seguinte forma (Snyder e colaboradores, 1997):

$$H = A + \frac{B}{v} + C v \quad (3.31)$$

onde v é a velocidade de escoamento, H é a altura equivalente de um prato teórico, quanto menor o prato teórico melhor a eficiência da coluna. O parâmetro A se refere à formação de caminhos preferências e está relacionado diretamente ao empacotamento da coluna. O parâmetro B está relacionado à difusão longitudinal, e depende diretamente da velocidade de escoamento da fase móvel. O parâmetro C diz respeito às resistências a transferência de massa, engloba a resistência na fase móvel, na fase móvel estagnada e na fase estacionária.

Os valores dos coeficientes de correlação para cada pulso são mostrados nas Figuras. A comparação destes coeficientes é o primeiro indício de que diminuição no diâmetro das partículas levou a uma melhora considerável na resolução dos picos de eluição experimentais. Para todos os valores de vazão utilizados os coeficientes de correlação obtidos para a coluna preenchida com partículas de diâmetro 0,033cm foram superiores aos valores encontrados com as partículas de diâmetro 0,06cm, indicando uma melhor aproximação de uma curva de Gauss. Esta melhor aproximação à curva de Gauss significa que a curva de eluição apresenta o seu tempo de retenção mais bem definido no seu centro de massa.

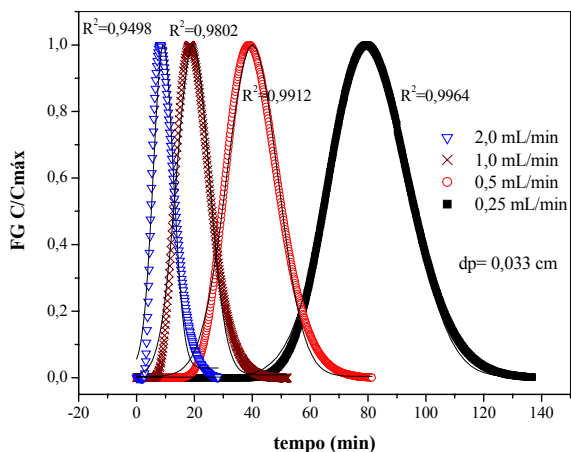


Figura 4.25 -CURVAS DE ELUIÇÃO DE FENILGLICINA UTILIZANDO DP=0,033CM

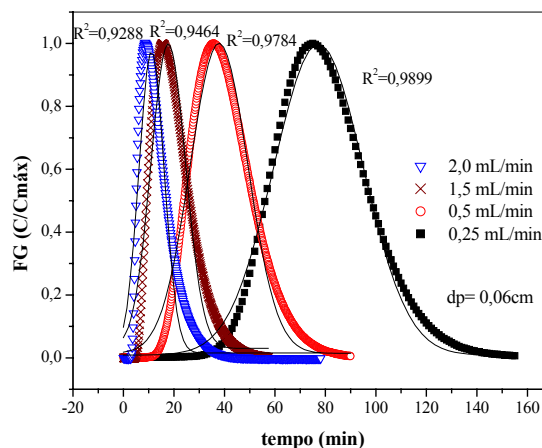


Figura 4.26 -CURVAS DE ELUIÇÃO DE FENILGLICINA UTILIZANDO DP=0,06CM

Como podem ser observados nas Figuras 4.25 e 4.26 os coeficientes de correlação, em ambos os casos, melhoraram com a diminuição da velocidade superficial (ou vazão). Este comportamento pode ser atribuído ao aumento do tempo de residência das moléculas de fenilglicina dentro da coluna, o que permitiu que estas moléculas atingissem o equilíbrio e melhorasse assim a forma da curva de eluição para a velocidade mais baixa. É interessante notar que em ambas Figuras, os coeficientes de correlação apresentam uma melhora significativa quando nas primeiras diminuições de velocidade (referentes às reduções de vazão de 2,0 a 1,0 mL/min). A diminuição para a mais baixa velocidade utilizada (equivalente a vazão de 0,5 mL/min) já apresenta uma melhora bem menos significativa, indicando que reduções maiores na velocidade não devem contribuir para a melhora da curva de eluição, podendo vir até a prejudicar o formato da curva devido ao aumento ao aumento excessivo da resistência a transferência de massa e a difusão molecular longitudinal.

A Figura 4.27 mostra a comparação de duas curvas de eluição cromatográfica obtidas para a injeção de fenilglicina numa mesma condição (vazão de 0,5 mL/min). De fato, analisando a figura, nota-se que a curva referente às partículas de diâmetro 0,033 cm apresentam uma melhor definição da curva de eluição, que é confirmada matematicamente por meio do cálculo do número de pratos teóricos de cada pulso. Ao comparar-se este parâmetro para as duas curvas, verifica-se que a curva obtida com as partículas de diâmetro menor apresenta um número de pratos teóricos, aproximadamente, duas vezes maior que a curva obtida com as partículas de diâmetro 0,06 cm. O aumento do número de pratos teóricos

significa que a altura de cada prato diminuiu, este comportamento pode ter ocorrido devido a uma diminuição da formação de caminhos preferências devido ao melhor empacotamento do leito com as partículas de menor diâmetro. A diminuição da resistência a transferência de massa também pode ter contribuído para a melhor definição do pico, pois a diminuição do diâmetro das partículas conduz a uma diminuição da camada do filme estagnado em volta de cada partícula.

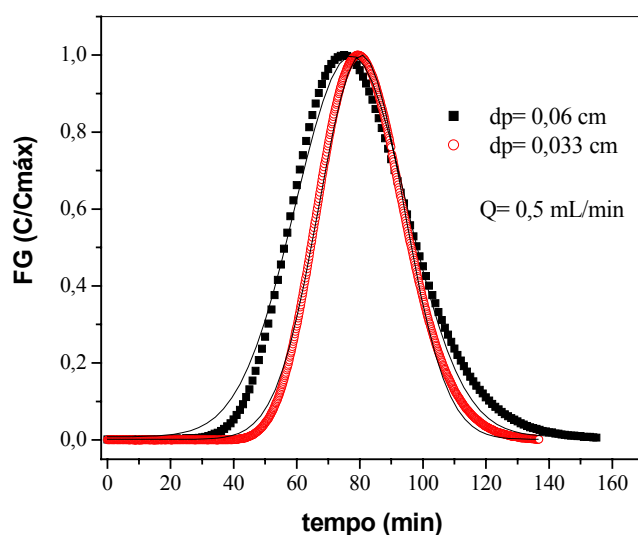


Figura 4.27 -COMPARAÇÃO DAS CURVAS DE ELUIÇÃO DE FG PARA DIFERENTES DP

Devido à melhora na eficiência da coluna demonstrada por meio das curvas de eluição de fenilglicina utilizando-se diâmetros de partícula de 0,033cm, foi escolhido este como o diâmetro a ser utilizado nos ensaios subsequentes. Estes ensaios foram realizados previamente aos que deram origem ao estudo da análise de momento, ou seja, os parâmetros determinados pela análise de momento já se referem às partículas com diâmetro médio menor.

4.4.4 - INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA NAS CURVAS DE ELUIÇÃO CROMATOGRÁFICA DE FENILGLICINA

Os ensaios de determinação da influência da temperatura foram realizados em três diferentes temperaturas, com injeções em pulso em quatro vazões distintas. Os resultados para os pulsos de fenilglicina estão apresentados nas Figuras 4.28, 4.29 e 4.30.

A Figura 4.28 mostra os pulsos de fenilglicina a temperatura de 10°C para diferentes vazões. Como já era esperada, a diminuição da temperatura de 25 para 10°C acarretou numa melhora do desempenho da coluna de adsorção com respeito à adsorção de fenilglicina. Este comportamento se reflete no aumento da dificuldade de ser retirada a fenilglicina da resina, ou seja, o tempo de retenção dentro da coluna aumenta, representado na Figura 4.28 pelo atraso dos picos de fenilglicina a 10°C em relação aos picos a 25°C mostrados na Figura 4.25. Devido à fragilidade das forças envolvidas nas interações hidrofóbicas, a diminuição da temperatura afeta de forma positiva essas interações diminuindo a agitação das moléculas e favorecendo assim a manutenção do equilíbrio atingido.

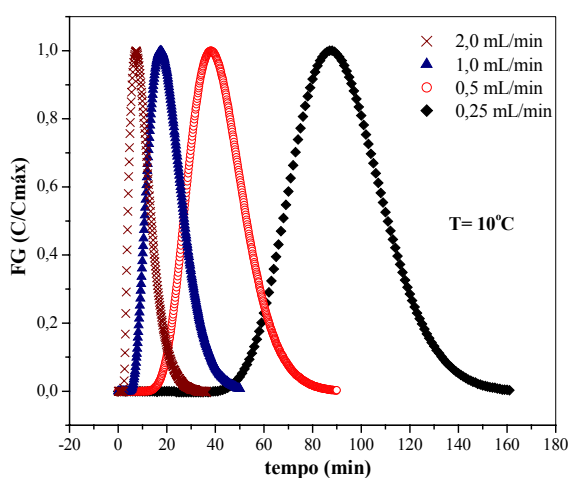


Figura 4.28 -CURVAS DE ELUIÇÃO DE FG UTILIZANDO TEMPERATURA DE 10°C

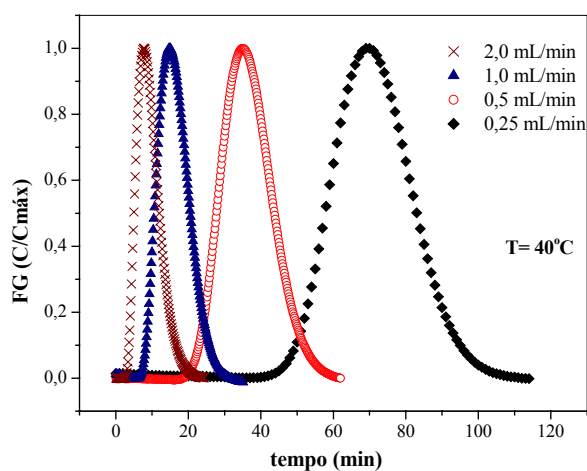


Figura 4.29 -CURVAS DE ELUIÇÃO DE FG UTILIZANDO TEMPERATURA DE 40°C

Por outro lado, o aumento na temperatura de 25°C para 40°C conduziu a uma diminuição do tempo de retenção das moléculas de fenilglicina dentro da coluna. Pelo mesmo princípio este aumento de temperatura levou a um aumento da agitação das moléculas prejudicando assim o equilíbrio das interações hidrofóbicas entre a resinas e as moléculas de fenilglicina. Esta diminuição nos tempos de retenção pode ser notada por meio da Figura 4.29.

Com objetivo de facilitar a visualização e comparação do efeito da temperatura nas curvas de eluição de fenilglicina, foi construído um gráfico comparativo, representado pela Figura 4.30, contendo três curvas de eluição para as três temperaturas testadas, 40°C, 25°C e 10°C, numa mesma condição de operação (vazão de 0,25mL/min).

Por meio da Figura 4.30 pode-se verificar claramente os comportamentos das curvas de eluição de fenilglicina para as distintas temperaturas e assim visualizar melhor os seus efeitos sobre estas curvas.

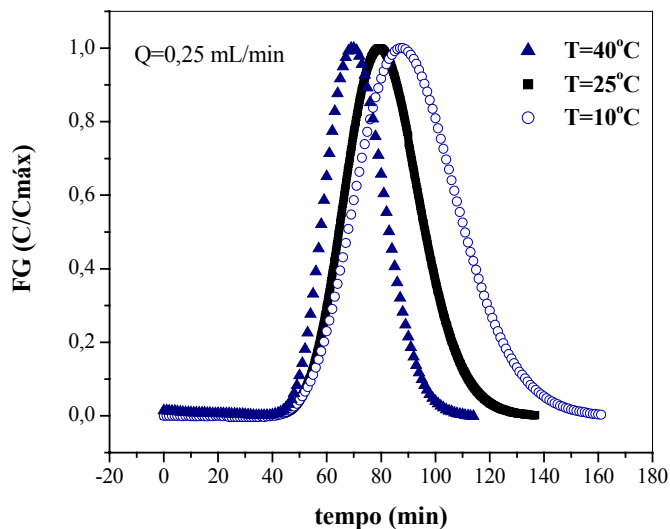


Figura 4.30 -COMPARAÇÃO DAS CURVAS DE ELUIÇÃO DE FG EM DIFERENTES TEMPERATURAS.

Neste trabalho optou-se por utilizar a temperatura de 25°C devido à reação de síntese ser realizada nesta temperatura. Mesmo assim, estes resultados são interessantes e servem como base para estudos futuros que busquem otimizar este processo. A falta de dados na literatura sobre adsorção de ampicilina e fenilglicina em resinas hidrofóbicas faz com que todos os resultados obtidos sejam de grande importância, pois vêm a contribuir com trabalhos que venham a ser desenvolvidos nesta área.

A Figura 4.31 apresenta as curvas de eluição cromatográfica de ampicilina para diferentes vazões, todas as curvas obtidas com d_p de 0,033cm e temperatura de 25°C. As linhas cheias mostradas no gráfico são referentes ao ajuste de uma curva de Gauss aos dados experimentais. Os coeficientes de correlação obtidos são mostrados no gráfico, e são $R^2 = 0,9701$, $R^2 = 0,9697$ e $R^2 = 0,9518$ para as vazões 0,5, 1,0 e 2,0 mL/min, respectivamente.

Assim como ocorreu com as curvas de eluição de fenilglicina, no caso da ampicilina se repetiu o efeito de melhora nas curvas de eluição com a diminuição da velocidade superficial. Neste caso específico as melhoras não foram tão significativas como para

fenilglicina . Como podem ser observados na Figura 4.31, os coeficientes de correlação apresentam pequenas melhoras para as diminuições de velocidade (referentes às reduções de vazão de 2,0 1,0 e 0,5 mL/min). Como a diminuição da altura do prato teórico é pequena, isto sugere que a redução da velocidade pode estar causando um aumento na dispersão axial (ou difusão longitudinal) e/ ou um aumento da resistência a transferência de massa de forma minimizar a melhora no formato da curva de eluição de ampicilina.

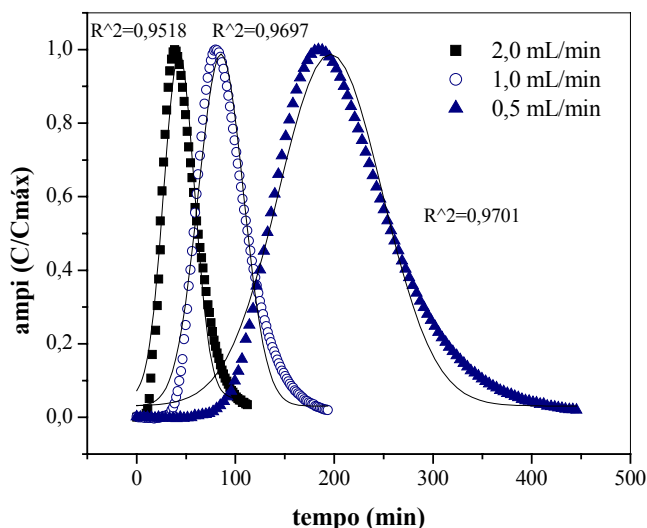


Figura 4.31 -COMPARAÇÃO DAS CURVAS DE ELUIÇÃO DE AMPICILINA

Comparando-se os resultados das curvas de eluição obtidas para fenilglicina, Figura 4.25 e ampicilina, Figura 4.31, para uma mesma condição de velocidade, constata-se que as curvas da fenilglicina possuem melhores coeficientes de correlação indicando que esse composto apresenta menos problema de dispersão axial e/ou menor resistência à transferência de massa. Estas diferenças entre os coeficientes de difusão longitudinal e resistência à transferência de massa foram apresentadas na Tabela 4.34, confirmando os resultados obtidos.

4.4.5 - ENSAIOS PARA DETERMINAÇÃO DAS CURVAS DE RUPTURA

A Figura 4.32 apresenta os resultados das curvas de ruptura obtidas para diferentes vazões de operação. Os experimentos foram realizados a temperatura de 25°C, utilizando-se

soluções de 5mM de fenilglicina . Como mostrado no gráfico, as vazões variaram de 0,5 a 2,0 mL/min.

A determinação das curvas de ruptura tem por objetivo estimar a melhor condição de operação da coluna. Por meio das curvas de ruptura da fenilglicina e ampicilina, pode-se avaliar a fração de leito que é carregada para cada um, e desta maneira, determinar que comprimento da coluna não é usado pelos compostos individualmente.

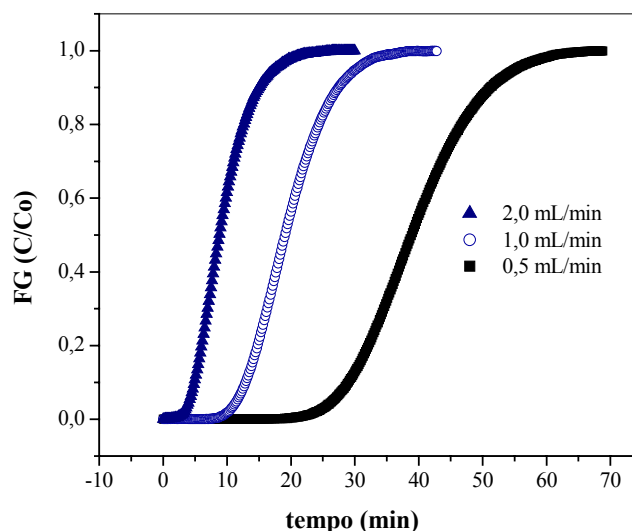


Figura 4.32 - CURVAS DE RUPTURA PARA FENILGLICINA EM DIFERENTES VAZÕES

A perda da capacidade de adsorção de uma coluna não significa que toda resina esteja saturada com o composto de interesse, indica apenas que este composto específico não consegue mais ser adsorvido pela resina. Por esse motivo é que compostos com afinidades distintas pela coluna apresentam diferentes curvas de ruptura nas mesmas condições de operação.

Utilizando as curvas de ruptura mostradas na Figura 4.32, pode-se estimar que para a vazão de 0,5 mL/min, foi utilizado aproximadamente 30% do leito, ou seja, dos 15cm de altura de coluna, foram gastos apenas 5cm. Este valor baixo encontrado para a saturação da coluna com fenilglicina já esperado, pois este composto apresenta pouca afinidade com a resina e desta forma atinge o seu equilíbrio em pouco tempo.

Apesar de, neste trabalho, ter-se optado por utilizar como padrão a temperatura de 25°C, ensaios de determinação de curvas de ruptura e dessorção à diferentes temperaturas foram realizados. A avaliação da influência da temperatura sobre a forma das curvas de

ruptura pode auxiliar, estudos futuros, na escolha de diferentes temperaturas para as etapas de adsorção e dessorção dependendo do efeito que se deseje sobre o compostos de interesse.

A Figura 4.33 apresenta uma composição das curvas de ruptura e eluição obtidas para fenilglicina em diferentes temperaturas. A temperatura de 40°C apresenta uma redução significativa, em relação às outras temperaturas, no tempo do total para adsorção e eluição completa da fenilglicina . Devido à baixa afinidade deste composto com a coluna não houve variação significativa quando se reduziu a temperatura de 25°C para 10°C, as curvas obtidas alguma diferença no formato para a etapa de eluição, apresentam um tempo total entre adsorção e eluição muito parecido.

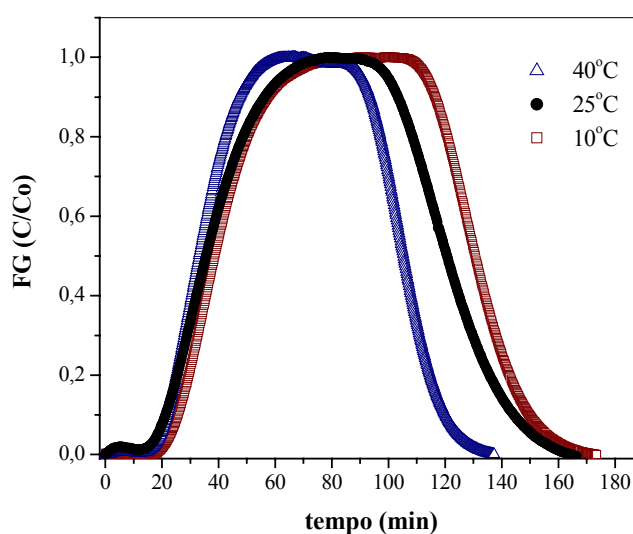


Figura 4.33 — COMPOSIÇÃO DAS CURVAS DE RUPTURA E ELUIÇÃO OBTIDAS PARA FENILGLICINA EM DIFERENTES TEMPERATURAS.

Os resultados de comparação entre as curvas de ruptura para ampicilina e fenilglicina em uma mesma condição de vazão e temperatura, 0,5mL/min e 25°C são apresentados nas Figuras 4.34 e 4.35. A primeira figura mostra as curvas de ruptura para ambos compostos em função do tempo de eluição, que é o meio mais comum de se apresentar este tipo de resultado, pois os dados já se encontram nesta forma. A segunda figura traz as mesmas curvas apresentadas agora como função do número de volumes do leito.

Como mostrado no Capítulo 2, a mudança na forma de apresentar as curvas de ruptura, construindo-as em função do nº de volumes de leito, é geralmente utilizada para auxiliar na comparação de diferentes adsorventes com relação a um composto de interesse. No caso

específico das curvas de ruptura mostradas na Figura 4.35, a comparação está sendo feita como função do composto a ser adsorvido para um mesmo adsorvente. Como se pode observar a fenilglicina, que é o composto menos adsorvido, necessita de um número menor de volumes de leito para ser eluída, cerca de 3 vezes menos volumes de leito que a ampicilina. Por outro lado, a ampicilina por apresentar maior afinidade com a resina precisa de mais volumes de leito para que seja retirada da coluna, o que está de acordo com o que se esperava deste composto pelos resultados até aqui obtidos.

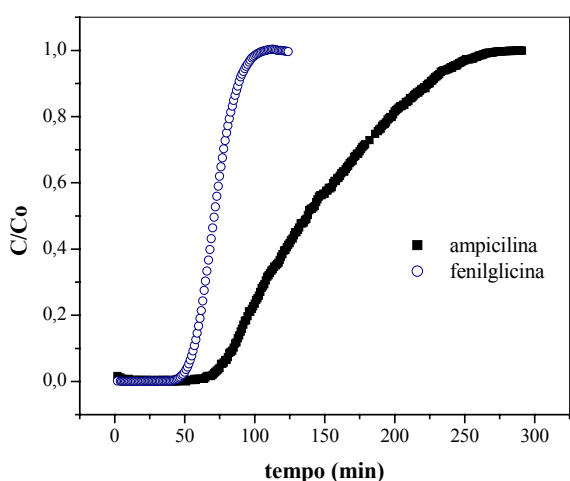


Figura 4.34 -CURVAS DE RUPTURA PARA AMPICILINA E FENILGLICINA COMO FUNÇÃO DO TEMPO

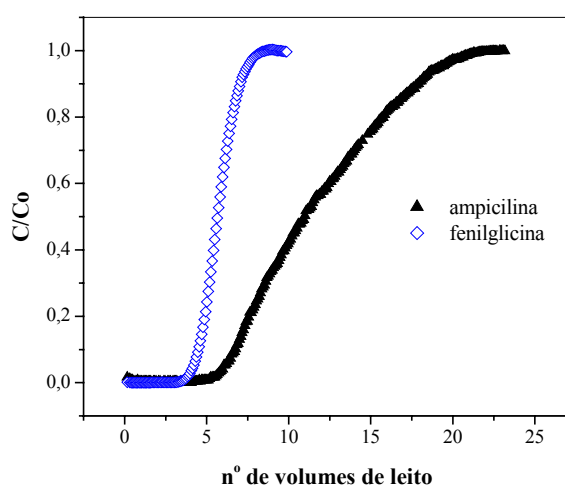


Figura 4.35 -CURVAS DE RUPTURA PARA AMPICILINA E FENILGLICINA COMO FUNÇÃO DO N^o DE VOLUMES DE LEITO

A comparação das curvas apresentadas na Figura 4.35 já nos mostrava que era possível a separação dos compostos devido aos tempos de saturação serem muito diferentes, ou seja, quando começava a saturação da coluna com ampicilina, a fenilglicina já havia saturado o leito.

4.4.6 - ENSAIOS DE SEPARAÇÃO DE AMPICILINA E FENILGLICINA

As Figuras 4.36, 4.37 e 4.38 mostram as curvas de eluição para uma mistura de ampicilina e fenilglicina de concentração 5mM, pH=6,5, em diferentes vazões, 2,0, 1,0 e 0,5 mL/min, respectivamente.

Assim como foi lembrada a Equação de Van Deemter antes de iniciar-se a discussão dos resultados anteriores, parece interessante recordar que, nesta etapa do trabalho, foram escolhidos o n° de pratos teóricos e a resolução de separação como parâmetros para avaliar e comparar a eficiência das variáveis testadas. De forma a facilitar a leitura, vale a pena lembrar que o número de pratos de teóricos foi calculado dividindo-se a altura da coluna pela altura do prato teórico obtida a partir da Equação (3.19). Já a resolução foi calculada pela Equação (3.31), ambas equações são lembradas abaixo:

$$\mathbf{HETP} \equiv \mathbf{L} \left(\frac{\sigma^2}{t_R^2} \right) \quad (3.19)$$

$$\mathbf{Re s} = \frac{2 (T_{R2} - T_{R1})}{(w_2 + w_1)} \quad (3.31)$$

Como podem ser observadas nas Figuras 4.36, 4.37 e 4.38 as diminuições de velocidade (reduzindo-se as vazões) conduzem a uma melhora na separação dos compostos. A determinação da resolução de separação das curvas de eluição dos compostos comprava que a diminuição da velocidade (diminuindo-se a vazão), leva a uma melhora da resolução de separação dos compostos. Os valores de resolução obtidos foram de 1,06, 1,43 e 1,60 para as vazões de 2,0, 1,0 e 0,5 mL/min, respectivamente. A avaliação dos valores de resolução de separação atingidos demonstra que o ganho na resolução foi maior quando se reduziu a vazão de 2,0 para 1,0. Apesar de um novo ganho na resolução quando a vazão foi trazida para a metade, de 1,0 para 0,5 mL/min, este foi menor do que o primeiro, indicando que não há necessidade de trabalhar com vazões abaixo de 0,5 mL/min.

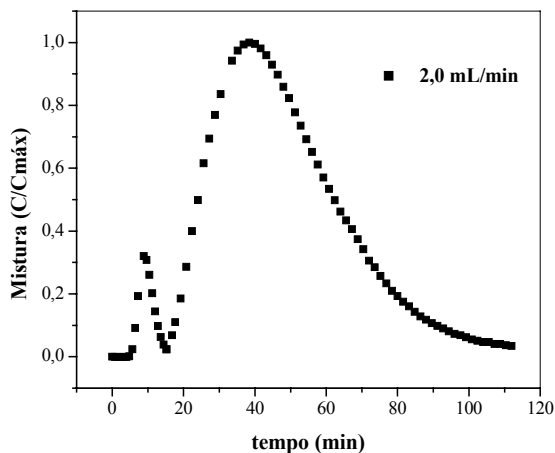


Figura 4.36 -SEPARAÇÃO DE AMPICILINA E FG USANDO VAZÃO DE 2,0 mL/MIN

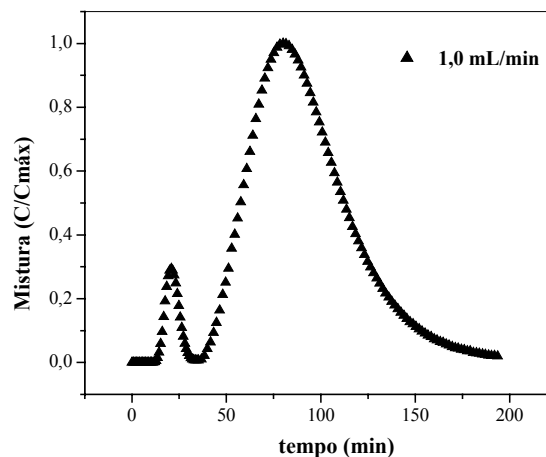


Figura 4.37 -SEPARAÇÃO DE AMPICILINA E FG USANDO VAZÃO DE 1,0 mL/MIN

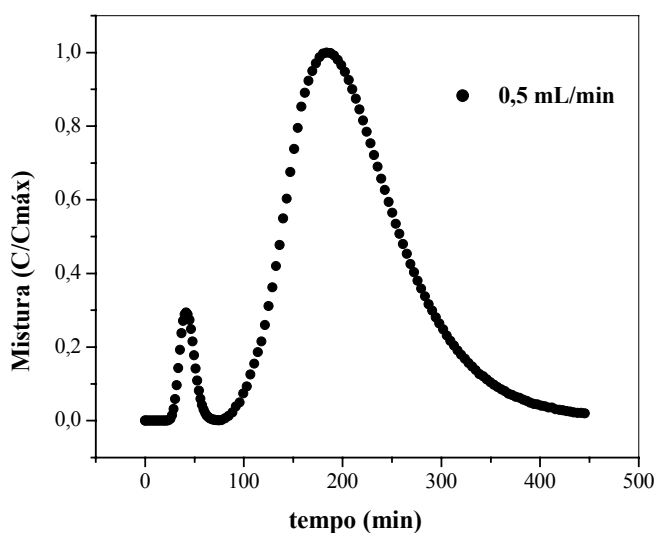


Figura 4.38 -SEPARAÇÃO DE ampi e FG USANDO VAZÃO DE 0,5 mL/MIN

Os resultados obtidos para misturas de ampicilina e fenilglicina apontam para uma boa separação dos compostos utilizando-se a vazão de 0,5 mL/min. Desta forma, o objetivo principal do trabalho foi alcançado, utilizando a resina XAD-4, separou-se ampicilina a partir de uma mistura contendo fenilglicina. Porém, com o objetivo de estudar a viabilidade de utilizar o processo de adsorção também como um processo de concentração ou pelo menos minimizar o volume de eluição dos compostos, foram realizados ensaios para verificar a

influência da presença de etanol na fase móvel, na eficiência de separação. A idéia inicial era obter uma fase móvel contendo etanol, de forma a separar os compostos e concentra-los simultaneamente.

4.4.7 - EFEITO DO ETANOL NA SEPARAÇÃO E CONCENTRAÇÃO DOS COMPOSTOS (COLUNA K9/15)

Os ensaios para determinar a influência da presença de etanol na fase móvel, foram inicialmente realizados na coluna K9/15, de acrílico. Estes resultados foram importantes para que se pudesse efetuar uma comparação com aqueles obtidos anteriormente sem a presença de etanol na fase móvel. Contudo, não foi possível se fazer uma grande variedade de experimentos, pois o material de que é feita a coluna não permitia o seu uso contínuo com soluções que contivessem metanol, o acrílico não suporta a presença de solventes orgânicos. Mesmo assim, alguns experimentos foram possíveis de serem realizados e seus resultados são apresentados e discutidos a seguir.

As Figuras 4.39 e 4.40 apresentam uma comparação entre as curvas de eluição ampilina obtidas na presença e ausência de etanol na fase móvel.

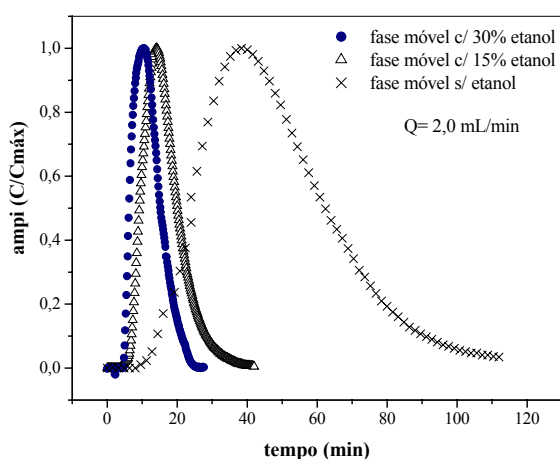


Figura 4.39 -EFEITO DO ETANOL NAS CURVAS DE ELUIÇÃO DE ampil (FUNÇÃO DO TEMPO).

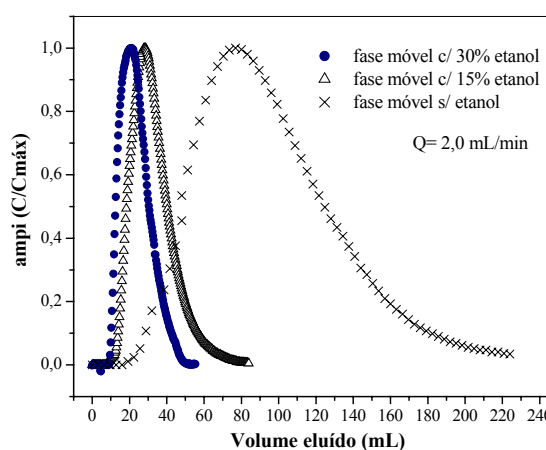


Figura 4.40 -EFEITO DO ETANOL NAS CURVAS DE ELUIÇÃO DE ampil (FUNÇÃO DO VOL. DE ELUIÇÃO).

A Figura 4.39 expressa a curva de eluição de ampicilina em função do tempo, que vem a ser a forma mais usual de se apresentar este de resultado, pois como comentado anteriormente os dados são obtidos desta forma. Porém, como o interesse destes experimentos era verificar a possibilidade de se utilizar um conteúdo de etanol na fase móvel visando a concentração dos compostos, a forma mais interessante para se apresentar as curvas de eluição parece ser em função do volume eluído. A Figura 4.40 apresenta as mesmas curvas de eluição da Figura 4.39, porém agora expressas em função do volume eluído.

Como pode ser observado na Figura 4.40, ocorre uma queda significativa no volume de eluição necessário para que o pulso de ampicilina atravessasse a coluna. Com uma concentração de 15% (v/v) de etanol na fase móvel, já é possível reduzir o volume de eluição em cerca de 3 vezes. Um aumento na concentração de etanol de 15 para 30% (v/v) na fase móvel conduz a uma diminuição no volume de eluição de, aproximadamente, 4 vezes.

A Figura 4.41 apresenta as curvas de eluição cromatográfica de fenilglicina, na presença e ausência de etanol na fase móvel, em função do volume de eluição. Como pode ser observada na figura, a fenilglicina também sofre influência devido presença de etanol na fase móvel.

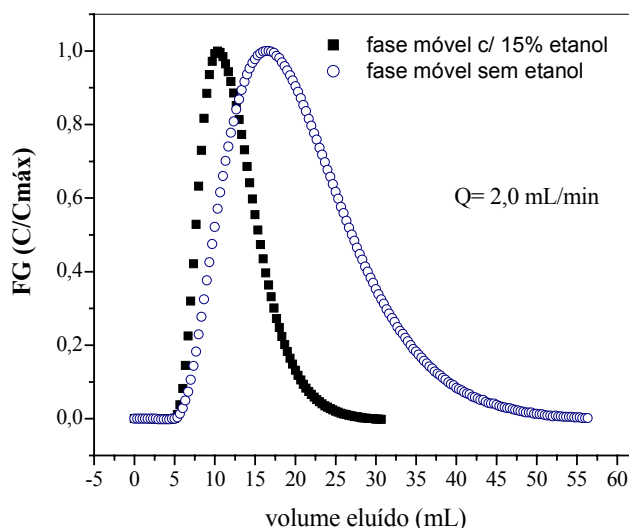


Figura 4.41 -EFEITO DA PRESENÇA DE ETANOL NAS CURVAS DE ELUIÇÃO DE FG COMO FUNÇÃO DO VOLUME DE ELUIÇÃO.

Quando o conteúdo de etanol utilizado foi de 15% (v/v) na fase móvel, foi encontrada uma redução de 50% no volume de eluição necessário. Quando se comparam os resultados obtidos para com os dois compostos, verifica-se que a ampicilina sofre maior influência do que a fenilglicina, este comportamento pode ser justificado devido a baixa afinidade da coluna pela fenilglicina, ou seja, esta sofre menos influência do etanol porque já apresenta, naturalmente, pouca interação com a resina. Por outro lado, a ampicilina por apresentar maior afinidade pela coluna, sofre maior influência da presença de etanol, pois apresenta uma perda significativa de interação com a resina. Essa perda na afinidade pela resina apresentada por ambos os compostos, é explicada pelo caráter altamente hidrofóbico que o etanol possui, ou seja, os compostos ficam mais “à vontade” quando rodeados de moléculas de etanol do que adsorvidos na resina.

A Figura 4.42 mostrada seguir, compara as curvas de eluição obtidas para ampicilina e fenilglicina sob as mesmas condições de operação, vazão de 1,0 mL/min. e conteúdo de etanol na fase móvel de 15% (v/v). A construção deste gráfico teve por objetivo avaliar a possibilidade de separação dos compostos na presença de etanol. Devido ao número restrito de experimentos realizados nesta coluna, esta comparação pode ser útil como uma aproximação do comportamento que seria obtido injetando-se um pulso contendo uma mistura dos dois compostos.

A comparação das duas curvas de eluição demonstra que dificilmente será possível separar os compostos na presença de etanol na fase móvel, pelo menos nas condições utilizadas neste sistema. Os resultados anteriores justificam a dificuldade de se conseguir separar a ampicilina da fenilglicina utilizando etanol na fase móvel, pois a ampicilina sofreu maior efeito da presença do solvente do que a fenilglicina, fazendo com que as curvas de eluição de ambos compostos quase se sobreponham, reduzindo de forma drástica a eficiência de separação da coluna.

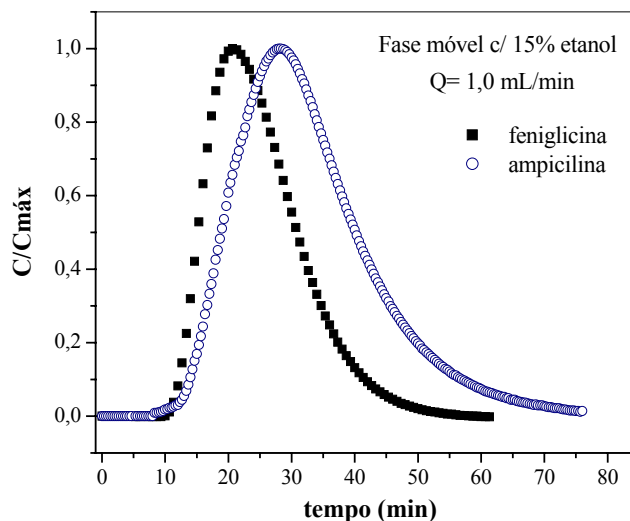


Figura 4.42 -COMPARAÇÃO ENTRE AS CURVAS DE ELUIÇÃO DE ampi E FG PARA 15% DE ETANOL NA FASE MÓVEL

Uma nova seqüência de experimentos foi realizada agora utilizando a coluna C50, de vidro, visando obter mais informações para confirmar ou não a dificuldade de separação dos compostos na presença de etanol. Como mencionado anteriormente, a mudança da coluna utilizada foi exclusivamente devido ao material de que a coluna K9/15 é feita não suportar o uso contínuo de etanol.

4.4.8 - EFEITO DO ETANOL NA SEPARAÇÃO E CONCENTRAÇÃO DOS COMPOSTOS (COLUNA C50)

Como comentado anteriormente, os resultados apresentados a seguir foram obtidos com uma coluna C50 com 1 cm de diâmetro interno e altura variável. Para o empacotamento com água foi definida, como padrão, a altura de 26 cm de leito para todos os ensaios. Este tipo de padronização, com água, torna-se importante principalmente quando o trabalho envolve a utilização de etanol como um componente na fase móvel. Isto porque este solvente causa uma variação na altura do leito, mais especificamente uma expansão do leito, de forma a modificar as condições de escoamento através da coluna.

A utilização de uma fase móvel contendo 50% de etanol (v/v) pode conduzir a um aumento de aproximadamente 10% na altura do leito, em condições de fluxo descendente. Sendo assim, a opção por fixar a altura de leito empacotado com água vem a auxiliar a comparação dos resultados obtidos. Deve ser lembrado também que a resina já se encontrava nas mesmas condições da fase móvel, conteúdo de etanol a ser utilizado, quando era empacotada na coluna.

As Figuras 4.43 e 4.44 apresentam os resultados de curva de eluição de fenilglicina obtidas em diferentes concentrações de etanol na fase móvel para duas condições distintas de vazão. A Figura 4.43 mostra o efeito do etanol nas curvas de eluição de fenilglicina como uma função do volume de eluição, como mencionado anteriormente este tipo de apresentação tem como objetivo facilitar a visualização da redução do volume necessário para que a fenilglicina seja totalmente eluída a partir da coluna. Pode-se notar que a utilização de 15% de etanol na fase móvel, como nos experimentos anteriores, conduz a uma redução de pelo menos 50% no volume necessário para eluir a fenilglicina utilizando a vazão de 0,25 mL/min.

Aparentemente, a utilização de uma coluna com maior altura de leito, proporcionou uma definição melhor dos tempos de eluição para cada condição de concentração de etanol, ou seja, diferentemente dos resultados anteriores agora se pode visualizar uma separação melhor dos picos quando se utilizou uma vazão de 0,25mL/min.

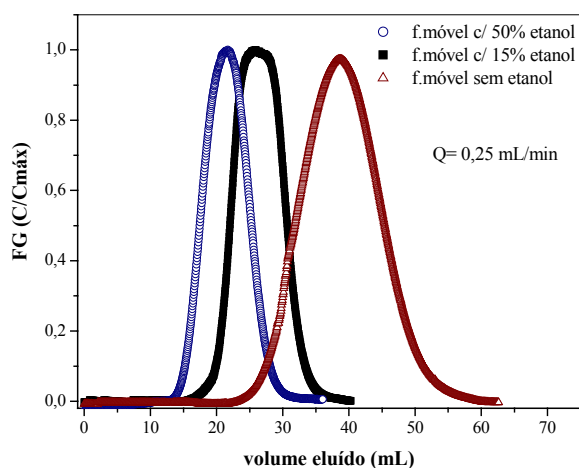


Figura 4.43 -EFEITO DO ETANOL NAS CURVAS DE ELUIÇÃO DE FG COMO FUNÇÃO DO VOL. DE ELUIÇÃO (COLUNA C50).

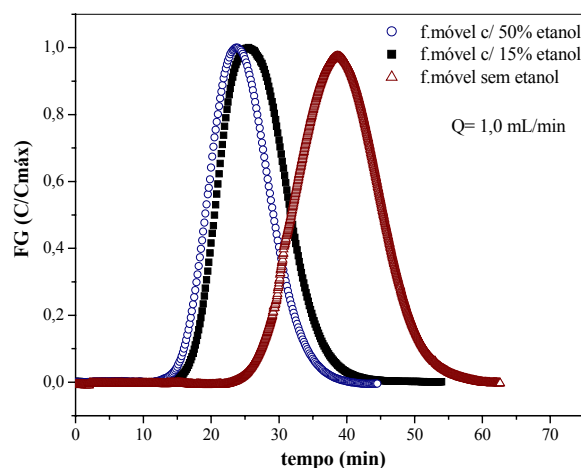


Figura 4.44 -EFEITO DO ETANOL NAS CURVAS DE ELUIÇÃO DE FG COMO FUNÇÃO TEMPO DE ELUIÇÃO (COLUNA C50).

Por outro lado, os resultados mostrados na Figura 4.44 indicam que o aumento na vazão de 0,25 para 1,0 mL/min faz com que ocorra uma aproximação nos tempos de eluição para ambas concentrações de etanol, ou seja, o efeito do etanol sobre os tempos de eluição é minimizado com o aumento da vazão de operação. Desta forma, pode-se verificar que para a vazão de 1,0 mL/min as curvas de eluição de fenilglicina apresentam-se praticamente sobrepostas. Sendo assim, pode-se esperar que diferenças nas curvas de eluição de fenilglicina devido a variação da concentração de etanol na fase móvel apenas sejam encontradas para vazões mais baixas, pelos 0,25 mL/min.

Os resultados obtidos para determinação do efeito da presença de etanol, na fase móvel, sobre as curvas de eluição de ampicilina estão apresentados nas Figuras 4.45, 4.46 e 4.47. A Figura 4.45 mostra a diferença entre as curvas de eluição de ampicilina variando-se a concentração de etanol na fase móvel com vazão de operação de 1,0 mL/min, como função do volume de eluição. Desta forma pode-se visualizar melhor a influência nas curvas de eluição de ampicilina.

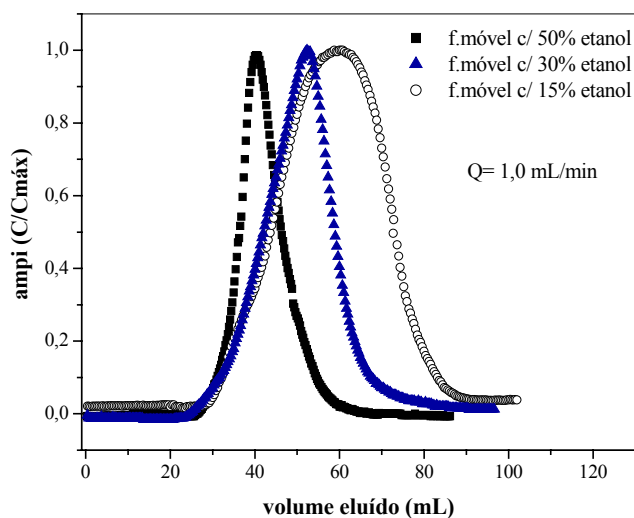


Figura 4.45 -CURVAS DE ELUIÇÃO DE ampi EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE ETANOL (COLUNA C50)

Como pode ser notada na figura, a influência da concentração de etanol na fase móvel sobre as curvas de eluição de ampicilina foi significativa, além disso, diferentemente dos resultados obtidos com a coluna K9/15, verificou-se agora uma diferença maior nos volumes de eluição para as diferentes concentrações de etanol utilizadas. Este comportamento, provavelmente, está associado ao aumento da altura de leito, que favoreceu este aumento na

diferença dos tempos de eluição e conseqüentemente distinção do efeito causado pela presença de etanol.

As Figuras 4.46 e 4.47 mostram uma comparação entre os resultados obtidos para as curvas de eluição de ampicilina utilizando-se diferentes concentrações de etanol na fase móvel e condições distintas de vazão para cada experimento. A Figura 4.46 foi construída em função do volume de eluição, novamente visando auxiliar na discussão dos resultados obtidos.

As curvas apresentadas em ambas figuras demonstram que a utilização de etanol na fase móvel conduziu a uma diminuição significativa do volume necessário para que fosse eluída toda a ampicilina. Reduções de, aproximadamente, 5 vezes no volume de eluição foram obtidas utilizando-se apenas 15% de etanol (v/v) na fase móvel. Estes resultados vêm ao encontro dos que já haviam sido obtidos anteriormente, com a coluna K9/15.

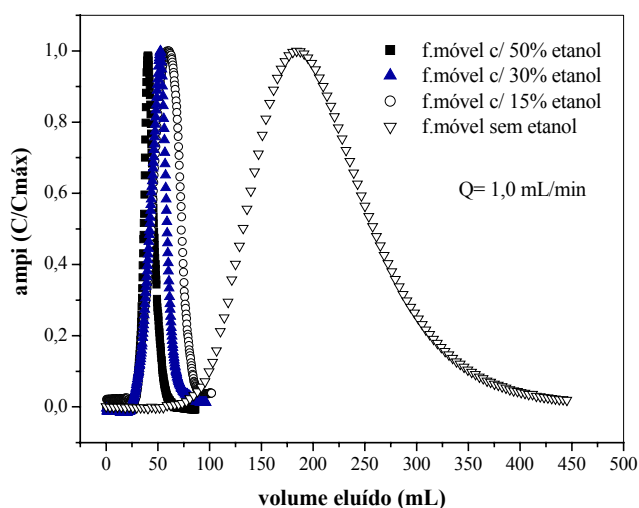


Figura 4.46 -EFEITO DA PRESENÇA DE ETANOL NAS CURVAS DE ELUIÇÃO DE ampi COMO FUNÇÃO DO VOLUME DE ELUIÇÃO (COLUNA C50).

A Figura 4.47 apresenta os resultados obtidos para as curvas de eluição de ampicilina utilizando-se diferentes concentrações de etanol na fase móvel com uma diminuição da vazão de operação de 1,0 para 0,25 mL/min. O objetivo era verificar se a redução na vazão implicaria numa alteração do efeito da presença de etanol. Conforme as curvas obtidas, pode-se determinar que mesmo trabalhando-se com uma vazão menor, a redução no tempo de eluição é significativa mediante a adição de etanol na fase móvel. A utilização de 15% de etanol conduz a uma redução de pelo menos 4 vezes do volume de eluição.

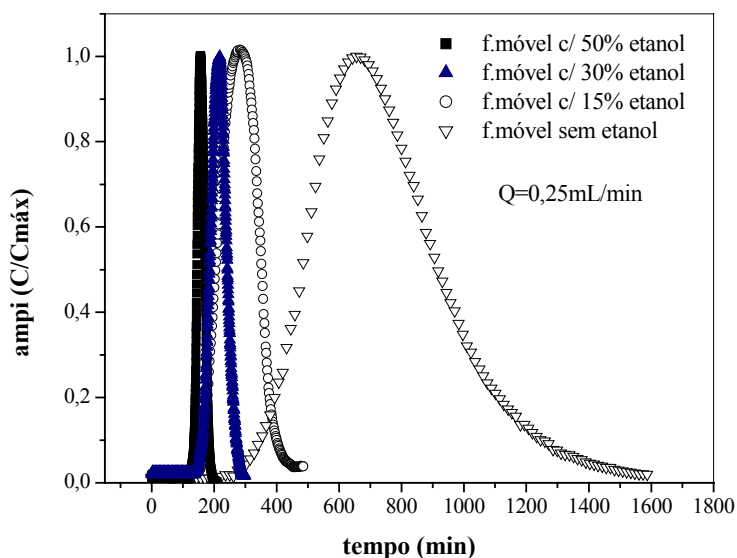


Figura 4.47 -EFEITO DA PRESENÇA DE ETANOL NAS CURVAS DE ELUIÇÃO DE ampi COMO FUNÇÃO DO TEMPO DE ELUIÇÃO (COLUNA C50).

Uma comparação entre os resultados mostrados nas Figuras 4.43 e 4.47 indica que assim como a fenilglicina apresentou maior diferença entre as curvas de eluição para a vazão de 0,25 mL/min, agora a ampicilina também revela apresentar um comportamento parecido. O fato da ampicilina e fenilglicina apresentarem comportamento semelhante em relação as suas curvas de eluição para a menor vazão, embora em diferentes ordens de grandeza, reforça a suposição de que o aumento na altura do leito influenciou na separação de suas curvas de eluição na condição de vazão utilizada.

Como visto anteriormente, os ensaios realizados na coluna K9/15, revelaram que a separação de ampicilina e fenilglicina utilizando etanol na fase móvel seria relativamente difícil. Desta forma, os resultados a seguir representam a tentativa de se separar os compostos na presença de etanol utilizando a coluna C50.

A Figura 4.48 apresenta a curva de eluição a partir de uma injeção em pulso de uma mistura de ampicilina e fenilglicina. A curva foi obtida utilizando-se fase móvel sem etanol, numa vazão de 0,25 mL/min. Como pode se observar, foi possível separar de forma eficiente os compostos, o que vem a confirmar bons resultados obtidos anteriormente quando utilizou-se a coluna K9/15.

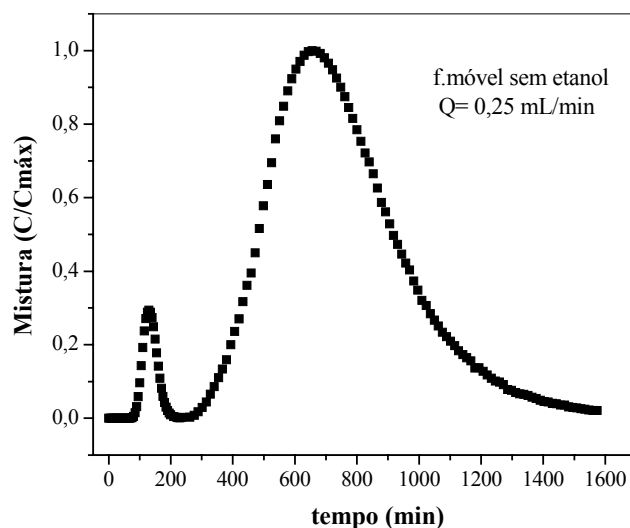


Figura 4.48 -SEPARAÇÃO DE ampi e FG USANDO VAZÃO DE 0,25 mL/min (COLUNA C50)

A tentativa agora era verificar se as fases móveis contendo etanol seriam capazes de separar os compostos, se não fossem, pelos determinar-se que caminhos poderiam ser testados em trabalhos futuros.

As Figuras 4.49 e 4.50 apresentam as curvas de eluição de misturas de ampicilina e fenilglicina para diferentes vazões, utilizando-se 15% de etanol na fase móvel. Como pode se observar, mesmo a diminuição de 4 vezes na vazão de operação, de 1,0 para 0,25mL/min, não foi suficiente para que se atingir-se uma boa eficiência de separação dos compostos. Os valores de resolução encontrados foram 0,64 e 0,80 para as vazões de 1,0 e 0,25mL/min, respectivamente, o que indica que ainda se está um pouco longe do valor mínimo de resolução para que se alcance 100% de separação. É possível que dependendo do grau de pureza desejado da ampicilina, a resolução de 0,80 encontrada com 15% de etanol na fase móvel, vem a ser de grande interesse do ponto de vista de se ter uma seletividade razoável aliada a um aumento na concentração dos compostos.

Aparentemente, a diminuição da faixa de concentração de etanol utilizada e/ou variações de parâmetros como temperatura e pH, podem ser úteis no auxílio para a otimização da separação de ampicilina e fenilglicina com a presença de etanol na fase móvel. Um aumento na altura do leito também pode auxiliar na separação, visto que houve uma melhora significativa na curva de eluição da mistura se comparada aos resultados obtidos com a coluna K9/15, na qual a separação não foi possível.

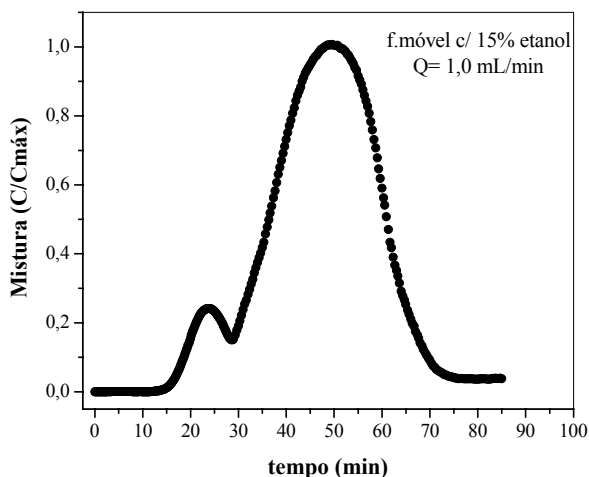


Figura 4.49 -SEPARAÇÃO DE ampi E FG USANDO VAZÃO DE 1,0 mL/min (COLUNA C50 C/ 15% ETANOL)

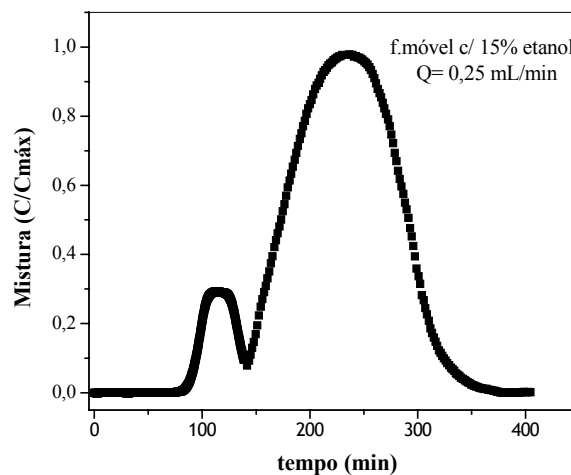


Figura 4.50 -SEPARAÇÃO DE ampi E FG USANDO VAZÃO DE 0,25 mL/min (COLUNA C50 COM 15% ETANOL)

A avaliação dos resultados obtidos com curvas de eluição dos compostos puros e em mistura indica que a separação e concentração de ampicilina no sistema testado seguem caminhos opostos, ou seja, à medida que se aprimora a separação, perde-se na etapa de concentração e vice-versa.

É possível que, trabalhando-se em outras condições de operação (pH, temperatura, altura de leito), possa se otimizar os processos de separação e/ou concentração dos compostos de forma a melhorar a performance global da coluna. Mesmo assim, é bem provável que um dos objetivos desejados se sobreponha ao outro, isto significa dizer que, se a opção desejada for separar os compostos, pode-se esperar que não sejam atingidos bons níveis de concentração dos mesmos. Por outro lado, se o objetivo determinado for concentrar os estes, a separação é que poderá ficar prejudicada.

Na verdade, este comportamento não se torna necessariamente um problema, pois como comentado anteriormente, quando o objetivo for concentrar os compostos para re-alimentar o reator, de forma a iniciar uma nova batelada de síntese, não haverá necessidade de separa-los. Sendo assim, a busca por aprimorar os efeitos de separar e concentrar os compostos em uma única etapa ou em um único processo é interessante e deve ser mantida como um objetivo a ser otimizado, porém deve-se enfatizar que o melhor desempenho de uma etapa que outra (separar ou concentrar) não impede o uso do processo como um dos possíveis a serem utilizados na seqüência de separação aplicada à síntese enzimática de ampicilina.

4.4.9 - RESULTADOS DOS ENSAIOS DE PRECIPITAÇÃO NO PONTO ISOELÉTRICO

Os ensaios de precipitação no ponto isoelétrico tiveram como objetivo verificar a eficiência da seqüência de etapas (solubilização dos cristais a pH básico /filtração/ precipitação da ampicilina ponto isoelétrico e filtração) para purificação do antibiótico, aplicadas a uma mistura de cristais, contendo fenilglicina, obtidos a partir da síntese enzimática de ampicilina.

As Tabelas 4.35, 4.36, 4.37 e 4.38 apresentam os graus de pureza de ampicilina e fenilglicina obtidos para diferentes condições de operação como temperatura de precipitação, pH de solubilização e o ácido utilizado para atingir o ponto isoelétrico da ampicilina. Os resultados de pureza apresentados nas tabelas seguintes estão expressos em forma percentual em base seca, e foram calculados em relação aos cristais de ampicilina obtidos após a precipitação no ponto isoelétrico e fenilglicina após a etapa de solubilização.

Tabela 4.35- GRAUS DE PUREZA DOS CRISTAIS DE AMPICILINA OU FENILGLICINA OBTIDOS UTILIZANDO HCL E TEMPERATURA DE 25°C NA PRECIPITAÇÃO DE AMPICILINA

HCl / 25°C	Ampicilina		Fenilglicina	
	Cristais	Solução	Cristais	Solução
Mistura inicial de cristais contendo ampicilina e fenilglicina	0,7916 g	-	0,2033 g	-
Solubilização a pH 8,5 e filtração dos cristais não dissolvidos mc= 0,0005g +0,0410g	0,0005 g	0,7911 g	0,0410 g (98,8% pureza)	0,1623 g
Acidificação da solução a pH 4,9 (pI ampi) c/ precipitação do antibiótico seguida de filtração mc= 0,5118g +0,0187g	0,5118 g (96,5% pureza)	0,2793 g	0,0187 g	0,1436 g

mc – massa de cristais

Uma comparação entre os resultados utilizando HCl obtidos a 25°C e 4°C apresentados nas Tabelas 4.35 e 4.36, mostra que a diminuição na temperatura de reprecipitação de ampicilina conduziu a uma melhora na eficiência do processo, de forma a obter-se um aumento na pureza dos cristais de ampicilina de 96,5 para 97,3%, quando a temperatura foi reduzida de 25 para 4°C. Aparentemente, a redução na temperatura afeta, proporcionalmente, mais a precipitação da ampicilina do que a fenilglicina, fazendo com que no resultado final se obtenha cristais de ampicilina com maior grau de pureza.

Tabela 4.36- GRAUS DE PUREZA DOS CRISTAIS DE AMPICILINA OU FENILGLICINA OBTIDOS UTILIZANDO HCL E TEMPERATURA DE 4°C NA PRECIPITAÇÃO DE AMPICILINA

HCl / 4°C	Ampicilina		Fenilglicina	
	Cristais	Solução	Cristais	Solução
Mistura inicial de cristais contendo ampicilina e fenilglicina	0,8050 g	-	0,2121g	-
Solubilização a pH 8,5 e filtração dos cristais não dissolvidos mc= 0,0005g +0,0410g	0,0010g	0,8040 g	0,0620 g (98,6% pureza)	0,1501 g
Acidificação da solução a pH 4,9 (pI ampi) c/ precipitação do antibiótico seguida de filtração mc= 0,5118g +0,0187g	0,6522 g (97,3% pureza)	0,1518 g	0,0179 g	0,1322 g

Como se pode observar, em ambos os casos, a quantidade total de ampicilina era, praticamente a mesma, mas a distribuição entre a massa restante em solução e a massa que precipitou é distinta. Isto significa dizer que foram precipitados cerca de 81,1% da ampicilina em solução a 4°C, contra 60% na temperatura de 25°C.

A Tabela 4.37 apresenta os valores de graus de pureza obtidos utilizando H₂SO₄ para baixar o pH ao ponto isoelétrico da ampicilina com temperatura controlada a 25°C. O pH de solubilização dos cristais iniciais foi elevado de 8,5 para 9,0. O objetivo desta elevação foi

verificar a influência do pH na proporção de cristais solubilizados para cada composto. Devido a diferente variação de solubilidade da ampicilina e fenilglicina com o pH, pode-se esperar que com o aumento do pH os compostos apresentam um aumento distinto nas suas solubilidades de forma a alterar a composição da solução obtida pela solubilização dos cristais iniciais.

Tabela 4.37- GRAUS DE PUREZA DOS CRISTAIS DE AMPICILINA OU FENILGLICINA OBTIDOS UTILIZANDO H₂SO₄ E TEMPERATURA DE 25°C NA PRECIPITAÇÃO DE AMPICILINA

H ₂ SO ₄ / 25°C	Ampicilina		Fenilglicina	
	Cristais	Solução	Cristais	Solução
Mistura inicial de cristais contendo ampicilina e fenilglicina	0,8080 g	-	0,2143 g	-
Solubilização a pH 8,5 e filtração dos cristais não dissolvidos mc= 0,0005g +0,0410g	0,0010 g	0,8070 g	0,0541 g (98,2% pureza)	0,1602 g
Acidificação da solução a pH 4,9 (pI ampi) c/ precipitação do antibiótico seguida de filtração mc= 0,5118g +0,0187g	0,5047 g (96,1% pureza)	0,3023 g	0,0204 g	0,1398 g

Quando se comparam os resultados apresentados na Tabela 4.37 àqueles obtidos anteriormente a pH 8,5 mostrados na Tabela 4.35, verifica-se que o aumento no pH para 9,0, não influenciou de forma significativa a composição final da solução de cristais solubilizada. A pureza dos cristais de fenilglicina se manteve no mesmo nível demonstrando que a mudança no pH de solubilização não foi sentida.

Quanto à mudança no ácido utilizado, não foi possível concluir a sua influência, aparentemente, os resultados da Tabela 4.36 indicam que a utilização de H₂SO₄ à temperatura de 25°C não apresentou influência importante no resultado final. Os cristais finais de ampicilina apresentaram leve melhora no seu grau de pureza quando comparados aos obtidos nas mesmas condições com HCl. Contudo, estão abaixo dos obtidos à temperatura de 4°C,

sendo assim optou-se por realizar mais um experimento utilizando H_2SO_4 à temperatura de $4^\circ C$, para auxiliar na determinação do efeito do ácido utilizado sobre a pureza dos cristais finais de ampicilina.

Os resultados do ensaio utilizando ácido sulfúrico à temperatura de $4^\circ C$ estão apresentados na Tabela 4.38. A comparação a ser discutida é realizada com os resultados obtidos utilizando HCl na mesma temperatura e apresentados na Tabela 4.36.

Tabela 4.38- GRAUS DE PUREZA DOS CRISTAIS DE AMPICILINA OU FENILGLICINA OBTIDOS UTILIZANDO H_2SO_4 E TEMPERATURA DE $4^\circ C$ NA PRECIPITAÇÃO DE AMPICILINA

$H_2SO_4 / 4^\circ C$	Ampicilina		Fenilglicina	
	Cristais	Solução	Cristais	Solução
Mistura inicial de cristais contendo ampicilina e fenilglicina	0,8006 g	-	0,2097 g	-
Solubilização a pH 8,5 e filtração dos cristais não dissolvidos mc= 0,0005g +0,0410g	0,0006 g	0,8000 g	0,0435 g (98,6% pureza)	0,1662 g
Acidificação da solução a pH 4,9 (pI ampi) c/ precipitação do antibiótico seguida de filtração mc= 0,5118g +0,0187g	0,6428 g (97,1% pureza)	0,1572 g	0,0193 g	0,1469 g

Os valores de pureza dos cristais de ampicilina e fenilglicina encontrados utilizando H_2SO_4 a $4^\circ C$, como ácido para atingir o ponto isoelétrico do antibiótico, estão bem próximos àqueles encontrados quando se utilizou HCl na a mesma temperatura. Valores de pureza da ordem de 97,3 e 97,1% foram encontrados para HCl e H_2SO_4 , respectivamente, ambos a temperatura de $4^\circ C$, o que demonstra não ter havido influência do ácido utilizado nesta temperatura, assim como aconteceu à temperatura de $25^\circ C$. Este comportamento é confirmado pelos percentuais de cristalização de ampicilina obtidos a partir da mistura durante a queda do pH, no qual foram encontrados valores de 80,3% com HCl e 81,1% com H_2SO_4 , em relação a ampicilina presente na mistura.

Aparentemente, a fenilglicina não sofreu influência da temperatura e do ácido testados. Para todas as condições testadas foram atingidos cerca de 12% de fenilglicina na forma de cristais após a diminuição do pH ao ponto isoelétrico da ampicilina, ou seja, mesmo com a queda da temperatura de 25°C para 4°C, a solubilidade da fenilglicina não apresentou variação significativa. Devido a pouca influência do pH na solubilidade da fenilglicina, já era previsto que o efeito do ácido utilizado na diminuição do pH fosse minimizado em relação a quantidade de cristais de fenilglicina formados durante esta queda do pH.

De uma maneira geral, os resultados obtidos, apesar dos resultados estarem levemente mais baixos, estão de acordo com os apresentados na literatura, Kaasgaard e colaboradores, 1992, 1993 e 1996. O estudo da precipitação no ponto isoelétrico ou reprecipitação da ampicilina a partir da mistura de cristais obtidos a partir de sua síntese enzimática, requer uma seqüência de trabalho, buscando otimizar este sistema que oferece bons rendimentos, aliados a um baixo custo de processo.

A decisão por qual processo de separação ou seqüência de etapas de separação a ser aplicada para purificação de ampicilina poderá ser efetuada com mais segurança quando os resultados em escala piloto de produção do antibiótico, utilizando o modelo de sistema definitivo, começarem a ser obtidos. Desta forma, a avaliação da viabilidade utilização de cada processo purificação, bem como a comparação entre eles, deverá apresentar uma melhor condição de sucesso, a medida a síntese enzimática tenha seu processo desenvolvido por completo. Como já mencionado anteriormente, a definição pelo objetivo no qual será utilizada determinada etapa de purificação e/ou concentração será fator decisivo para definir sua aplicabilidade.

✓ A partir dos resultados obtidos até o momento, propõe-se o seguinte protocolo para obtenção de ampicilina gerada na forma sólida contendo fenilglicina como impureza, obtidas a partir da síntese enzimática do antibiótico:

- Solubilização da mistura de cristais (ampicilina e fenilglicina), obtidos durante a síntese, a pH 8,5 ;
- Filtração da solução obtendo-se cristais de fenilglicina com alto grau de pureza;
- O filtrado é uma solução composta por ampicilina (em alta concentração) e fenilglicina. Redução do pH da solução para precipitação da ampicilina no seu ponto isoelétrico;

- Filtração da solução obtendo-se cristais de ampicilina com elevado grau de pureza;
- O filtrado contendo ampicilina e fenilglicina nos seus limites de solubilidade;
- Esta solução pode ser concentrada por adsorção na resina XAD-4 utilizando-se uma fase eluente contendo 15% de etanol; com retorno da solução concentrada em ampicilina e fenilglicina ao reator e favorecer assim a precipitação do antibiótico na batelada de síntese seguinte;
- Uma alternativa à concentração dos compostos é a separação dos mesmos utilizando a mesma resina, porém se a utilização de etanol na fase móvel; aparentemente, esta opção poderia ser aplicada a última batelada de síntese;

Uma alternativa ainda a ser considerada é o uso de etapas recristalização simples como objetivo de melhorar o grau de pureza dos cristais, porém como comentado anteriormente, esta técnica apresenta baixos rendimentos apesar de alcançar altos graus de pureza de cristais.

5. Conclusões

- ✓ A eficiência de adsorção do **EMFG** aumentou com o pH, enquanto a fenilglicina não apresentou variação significativa na sua eficiência de adsorção atingindo, um máximo de eficiência de **15%**, com as resinas **XAD-4** e **XAD-761**. A melhor eficiência, **89%**, foi encontrada com a resina **XAD-4** a pH 8,5.
- ✓ As eficiências de adsorção de ampicilina e **6-APA** diminuem com o aumento do pH. Seus maiores valores de eficiência foram **82%** de ampicilina com a **XAD-4** e **31%** de fenilglicina com a **XAD-761**, ambos alcançados a pH 4,5.
- ✓ As melhores seletividades para ampicilina foram atingidas com a resina **XAD-4** e seus valores foram **AMPI/FG (7,0)** a pH 8,5; **AMPI/EMFG (2,2)** a pH 4,5; **AMPI/6-APA (4,6)** a pH 7,5.
- ✓ A isoterma de **Langmuir** foi o modelo que melhor representou a adsorção de **AMPI**, enquanto a isoterma **Linear** foi a que melhor se ajustou aos dados de adsorção de **FG**, **EMFG** e **6-APA**, todos utilizando resina **XAD-4** a pH 6,5.
- ✓ Para as faixas de concentrações utilizadas neste trabalho as máximas capacidades de adsorção obtidas foram: Para **XAD-4** (**ampi**= 455mg/g resina; **6-APA**= 90mg/g resina; **EMFG**=1181mg/g resina; **FG**=14mg/g resina); Para **XAD-7** (**ampi**= 130mg/g resina; **6-APA**= 46mg/g resina; **EMFG**=205mg/g resina; **FG**=11mg/g resina); Para **XAD-761** (**ampi**= 110mg/g resina; **6-APA**= 57mg/g resina; **EMFG**=590mg/g resina; **FG**=16mg/g resina).

ENSAIO EM LEITO FIXO – COLUNA K9/15

- ✓ As curvas de eluição obtidas utilizando partículas de diâmetro **0,033cm** apresentaram uma melhora nas suas resoluções, refletidas no aumento de, aproximadamente, duas vezes no número de pratos teóricos.
- ✓ A temperatura influenciou as curvas de eluição de fenilglicina, aumentando seu tempo de retenção de **70** para **90** minutos quando a temperatura passou de **40°C** para **10°C**, ambos a vazão de **0,25 mL/min**.

- ✓ Por meio das curvas de ruptura dos compostos verificou-se que a **ampicilina** necessita de **3 vezes** mais volumes de leite do que a **fenilglicina** para ser eluída, demonstrando a maior afinidade da resina pelo antibiótico.
- ✓ Os **valores de resolução** obtidos para misturas de ampicilina e fenilglicina foram **1,06**, **1,43** e **1,60** para as vazões de **2,0**, **1,0** e **0,5 mL/min**, respectivamente. Os valores alcançados apontam para uma boa resolução de separação dos compostos a partir de um pulso da mistura, e mostram que a vazão de 0,5mL/min já é suficiente para obter-se resultados com alta eficiência de resolução.

ENSAIOS EM LEITO FIXO – COLUNA C50

- ✓ A utilização de etanol conduz a uma diminuição do volume de eluição necessário para ambos compostos. Para uma concentração de **15% de etanol** (v/v) na fase móvel, foram obtidas reduções de pelo menos **4 vezes** do volume de eluição para **ampicilina** e **2 vezes** para **fenilglicina**, apesar de, teoricamente, poderem ser atingidos valores na ordem de 10 vezes para ampicilina. Esses resultados apontam para a possibilidade do uso dessa técnica na concentração de uma solução de ampicilina no seu limite de solubilidade (em torno de 15mM)
- ✓ Nas condições testadas contendo etanol na fase móvel, não foram atingidas resoluções tão boas como às alcançadas anteriormente com fase móvel contendo 100% de água. A melhor **resolução** encontrada foi de **0,80**, para uma vazão de **0,25 mL/min** com concentração de etanol de **15% (v/v)**.

ENSAIOS DE PRECIPITAÇÃO NO PONTO ISOELÉTRICO

- ✓ Aparentemente, a **redução** na temperatura de **25°C** para **4°C** afeta mais a precipitação da ampicilina do que a fenilglicina, o que se reflete no aumento no grau de pureza dos cristais de ampicilina de **96,5** e **97,3%**, respectivamente.
- ✓ Valores semelhantes de graus de pureza foram encontrados para ampicilina a 4°C, **97,3** e **97,1%** utilizando **HCl** e **H₂SO₄**, respectivamente Este comportamento é confirmado pelos percentuais de cristalização de ampicilina obtidos **80,3%** com HCl e **81,1%** com H₂SO₄, em relação a ampicilina presente na mistura.
- ✓ A fenilglicina não sofreu influência da temperatura e do ácido testados. Foram atingidos cerca de **12%** de **fenilglicina** na forma de cristais após a diminuição do pH a 4,9.

✓ A partir dos resultados obtidos até o momento, propõe-se o seguinte protocolo para obtenção de ampicilina gerada na forma sólida contendo fenilglicina como impureza, obtidas a partir da síntese enzimática do antibiótico:

- Solubilização da mistura de cristais (ampicilina e fenilglicina), obtidos durante a síntese, a pH 8,5 ;
- Filtração da solução obtendo-se cristais de fenilglicina com alto grau de pureza;
- O filtrado é uma solução composta por ampicilina (em alta concentração) e fenilglicina. Redução do pH da solução para precipitação da ampicilina no seu ponto isoelétrico;
- Filtração da solução obtendo-se cristais de ampicilina com elevado grau de pureza;
- O filtrado contém ampicilina e fenilglicina nos seus limites de solubilidade;
- Esta solução pode ser concentrada por adsorção na resina XAD-4 utilizando-se uma fase eluente contendo 15% de etanol; com retorno da solução concentrada em ampicilina e fenilglicina ao reator e favorecer assim a precipitação do antibiótico na batelada de síntese seguinte;
- Uma alternativa à concentração dos compostos é a separação dos mesmos utilizando a mesma resina, porém se a utilização de etanol na fase móvel; aparentemente, esta opção poderia ser aplicada a última batelada de síntese;
- Uma alternativa ainda a ser considerada é o uso de etapas recristalização simples como objetivo de melhorar o grau de pureza dos cristais, porém como comentado anteriormente, esta técnica apresenta baixos rendimentos apesar de alcançar altos graus de pureza de cristais.

6. Sugestões

- ✓ Utilizar soluções compostas pelos cristais obtidos a partir da síntese de ampicilina, ou seja, injetar na coluna pulsos da mistura produzida no laboratório.
- ✓ Realizar ensaios com outras resinas para efeito de comparação do seu desempenho principalmente com respeito eficiência de separação e concentração dos compostos em relação aos resultados obtidos com a XAD-4.
- ✓ Avançar o estudo sobre a influência do conteúdo de etanol na fase móvel, trabalhando com concentrações mais baixas. Compara os efeitos sobre a eficiência separação e concentração dos compostos.
- ✓ Avaliar a influência do pH nos ensaios em pulso de cada composto, bem como da mistura, usando fases móveis que contenha etanol, e assim avaliar a utilização deste parâmetro na eficiência de separação e/ou concentração da ampicilina e fenilglicina.
- ✓ Verificar a influência da temperatura como um agente auxiliar na separação dos compostos, na presença e ausência de etanol.
- ✓ Avançar nos estudos do processo de cristalização partindo dos cristais obtidos na reação de síntese realizada no laboratório.
- ✓ Aumentar a altura de coluna utilizada, visando obter informações sobre a influência do aumento de escala e seu efeito na eficiência de separação e concentração dos compostos.
- ✓ Verificar o uso de zeólitas para retirada contínua da ampicilina em solução durante a reação.
- ✓ Avaliar a utilização de sais para auxiliar a interação hidrofóbica visando melhorar a eficiência de adsorção dos compostos a resina.

7. Referências Bibliográficas

- BARBOZA, M. **Estudo cinético de adsorção, modelagem dinâmica e otimização de processo contínuo de purificação de cefalosporina C**, Tese de Doutorado, Faculdade de Engenharia de Alimentos - Universidade Estadual de Campinas, 1998.
- BAUTISTA, L. F.; MARÍNEZ, M. AND ARACIL J. **Adsorption Equilibrium of α -Amylase in Aqueous Solutions**. *AIChE J.* Vol. 45, n^o 4, pp. 761-768, 1990.
- BELTER, P.A.; CUSLLER, E.L.; WEI-SHOU, H., **Biosepartions: downstream processing for biotechnology**, Wiley-interscience, 1988.
- BHANDARI, M.V.; YONEMOTO, T. AND JUVEKAR, A.V. **Investigating the differences in acid separation behaviour on weak base ion exchange resins**. *Chemical Engineering Science*. Vol. 55, pp. 6197-6208, 2000.
- BJURSTROM, E. **Biotechnology- Fermentation and Downstream Processing**. *Chem. Enginnering*. Vol. 92, pp. 126-158,1985.
- BLINKOVSKY, A.M.; MARKARYAN A. N. **Synthesis of β -lactam antibiotics containing α -aminophenylacetyl group in the acyl moiety catalyzed by D-(-)-phenylglycyl- β -lactamide Amidohydrolase**. *Enz. Microbiol. Technol.*. Vol. 15, pp. 965-973, 1993.
- BOESTEN, W. H. J.; MOODY, H. M.; ROOS, E. C. **Process for the recovery of ampicillin**, United States Patent: 5,916,762, June 29, 1999.
- BRUGGINK, A.; ROOS, E. C.; VROOM, E. **Penicillin acylase in the industrial production of β -lactam antibiotics**, *Organic Process Resarch & Development*. Vol. 2, pp. 128-133, 1998.
- BRUGGINK, A. **Synthesis of β -lactam antibiotics**. Kluwer, Dordrecht, 2001.
- CARDIAS, H. T. C. **Estudo da síntese de antibióticos β -lactâmicos semi-sintéticos catalisada por diferentes derivados de penicilina G acilase**. Tese de Doutorado, São Carlos, SP, UFSCar, 2000.

- CHAUBAL, M.V.; PAYNE, F.G.; REYNOLDS, C.H. AND ALBRIGHT, R.L. **Equilibria for the Adsorption of Antibiotics onto Neutral Polymeric Sorbents: Experimental and Modeling Studies**. Biotech. and Bioengineering. Vol 47, pp. 215-226, 1995.
- CLAUSEN, K. E DEKKERS, R.M. **Process for preparation of β -lactams at constantly high concentration of reactants**. US Patent n° 6.048.708, 2000.
- CLAUSEN, K. **Method for the preparation of certain β -lactam antibiotics**, US Patente n° 5.470.717, 1995.
- CLAUSEN, K.; NIELSEN, A.; PETERSON, N. E NIKOLOV, A. **Acylation method for penicillins and cephalosporins**. US Patent n° 5.753.458., 1998.
- COLE, M. **Factors affecting the synthesis of ampicillin and hydroxyenicillins by cell-bound penicillin acylase of Escherichia coli**. Biochem. Journal. Vol. 115, pp. 757-764, 1969b.
- COLE, M. **Penicillins and Other Acylamino Compounds Synthesized by Cell-Bound Penicillin Acylase of Escherichia coli**. Biochem. Journal. Vol. 115, pp.747-756, 1969a.
- COWLEY, B. R.; MARTIN, D. G. **Process for preparing penicilin antibiotics**, United States Patent: 3,971,775, July 25, 1976.
- COWLEY, B.R. e MARTIN, D.G. **Process for preparing penicillin antibiotics**, US Patent n° 3.971.775, 1976.
- CREMASCO, M.A.; HRITZKO, B.J.; YI XIE, and WANG, N.H.L. Parameters estimation for amino acids adsorption in a fixed bed by moment analysis, Brazilian Journal of Chemical Engineering. Vol.18, n° 02, pp. 181-194, Junho 2001
- CROCI, M. E COTTI, G. **Manufacture of semi-syntetic penicillins antibiotics**, United States Patent n° 4.182.709, 1980b.
- CROCI, M. E COTTI, G., **Manufacture of semi-syntetic penicillins antibiotics**, US Patent n° 4.181.656, 1980a.
- CUSSLER, E.L. **Diffusion: Mass Transfer in Fluid Systems**. Cambridge University Press, 1997.
- DIAGO, J. e LUDESCHER, J. **β -lactam production**. US Patent n° 5.719.276, 1998a.

- DIAGO, J. e LUDESCHER, J. **Processes for the production of alpha-aminoacyl-penicillin and 7-alpha.** US Patent nº 5.840.885, 1998b.
- DIENDER, M.B.; STRAATHOF, A.J.J. e HEIJNEN, J.J. **Predicting Enzyme Catalyzed Reaction Equilibria in Cosolvent-Water Mixtures as a Function of pH and Solvent Composition.** Biocatalysis and Biotransformation. Vol. 16, pp. 275- 289, 1998a.
- DIENDER, M.B.; STRAATHOF, A.J.J.; VAN DER DOES, T.; ZOMERDIJK, M. e HEIJNEN, J.J. **Course of pH during the formation of amoxicillin by a suspension-to-suspension reaction.** Enzyme. Microbial Technology. Vol 27, pp. 576- 582, 2000.
- DIENDER, M.B.; STRAATHOF, A.J.J.; VAN DER WIELEN, L.A.M.; RAS, C. e HEIJNEN, J.J. **Feasibility of the thermodynamic controlled synthesis of amoxicillin.** Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic. Vol. 5, pp. 249- 253, 1998b.
- DROUGUETT, S.E. Elementos de Catalisis Heterogênea. Washington, D.C. Editora Eva V. Chesneau, 1983.
- FERNADEZ-LAFUENTE, R.F.; ROSSEL, C.M.; GUIÓSÁN,J.M. **Enzyme Reaction Engineering: Synthesis of Antibiotics Catalysed by Stabilized Penicillin G Acylase in the Presence of Organic Cosolvents.** Enzyme Microbiological Technology. Vol. 13, pp. 898-905, 1991.
- FERNADEZ-LAFUENTE, R.F.; ROSSEL, C.M.; GUIÓSÁN,J.M. **The presence of Methanol Exerts a Strong Modulation of the Synthesis of Different Antibiotics by Immobilized Penicillin G Acylase.** Enzyme Microbiological Technology. Vol. 23, pp. 305-310, 1998.
- FERNADEZ-LAFUENTE, R.F.; ROSSEL, C.M.; GUIÓSÁN,J.M. **The use of stabilised penicillin acylase derivatives improves the design of kinetically controlled synthesis.** Journal of Molecular Catalysis A: Chemical. Vol. 101, pp. 91-97, 1995.
- FERNADEZ-LAFUENTE, R.F.; ROSSEL, C.M.; PIATKOWSKA, B. e GUIÓSÁN,J.M. **Synthesis of antibiotics (cephaloglycin) catalyzed by penicillin G acylase: evaluation and optimization of different synthetic approaches.** Enzyme Microbiological Technology, vol. 19, 9-14, 1996.

- FERREIRA, A. L. O. **Estudo da síntese enzimática de ampicilina catalisada por penicilina G acilase imobilizada em gel de agarose**, Tese (Mestrado), Universidade Federal de São Carlos, 1999.
- GARSIDE, J. **Separation technology the next ten years** Institution of Chemical Engineers, 1994.
- GHOSH, A.C.; BORA, M.M & DUTTA, N.N. **Developments in liquid membrane separation of beta-lactam antibiotics**. Bioseparation. Vol. 6, pp. 91-105, 1996.
- GROSSMAN, J. H.; HARDCASTLE, G. A. **Production of amoxillin**, United States Patent: 3,980,637, Sept. 14, 1976.
- GRZEGORCZYK S. AND CARTA, G. **Adsorption of Amino acids on Porous Polymeric Adsorbents-I. Equilibrium**. Chemical. Eng. Science. Vol. 51, pp. 807-817, 1996.
- HERNANDEZ-JUSTIZ, O.; FERANANDEZ-LAFUENTE, R.; TERRENI, M.; GUIZAN, M.J. **Use of Aqueous Two-Phase Systems for in situ Extraction of Water Soluble Antibiotics During Their Synthesis by Porous Supports**, Biotechnology and Bioengineering, Vol. 59, n° 1, pp.73-79, 1998.
- HERNÁNDEZ-JÚSTIZ, O.; TERRENI, M.; PAGANI, G.; GARCÍA, J.L.; GUISÁN, J.M.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R. **Evaluation of different enzymes as catalysts for the production of β -lactam antibiotics following a kinetically controlled strategy**. Enzyme Microb. Technology. Vol. 25, pp. 336-343, 1999.
- HOWELL, J.A.; SNACHEZ, V. AND FIELD, R.W. **Membranes in Bioprocessing: Theory and Applications**. Chapman Hall, First Edition, 1993.
- KAASGAARD, S.; KARLSEN, L.; SCHNEIDER, I. **Process for separation of two solid components**, World Intellectual Property Organization: WO92/12782, August 6, 1992.
- KAASGAARD, S.; ULRICH, H.; CLAUSEN, K.; JENSEN, T. **Separation method**, World Intellectual Property Organization: WO 93/23164, November 25, 1993.
- KAASGAARD, S.; VEITLAND, U. **Process for preparation of β -lactams utilizing a combined concentration acylating agent plus β -lactam derivative of at least 400nm.**, United States Patent US 5525483, 1996.

- KASCHE, V. **Ampicillin and cephalixin synthesis catalysed by *E. coli* penicillin amidase. Yield due to substrate recycling.** Biotechnology Letters. Vol 7, pp. 877-882, 1985.
- KASCHE, V. **Correlation of experimental and theoretical data for artificial and natural systems with immobilized biocatalysts.** Enzyme Microb. Technology. Vol. 5, pp. 2-13, 1983.
- KASCHE, V. **Mechanism and yields in enzyme catalyzed equilibrium and kinetically controlled synthesis of β -lactam antibiotics, peptides and other condensation products.** Enzyme Microb. Technology. Vol 8, n^o4, pp. 4-16, 1986.
- KASCHE, V.; HAUFLER, U. e RIECHMANN, L. **Equilibrium and kinetically controlled synthesis with enzymes: semisynthesis of penicillins and peptides.** Methods in Enzymology. Vol. 136, pp. 280-292, 1987.
- KASCHE, V.; HAUFLER, U. e ZÖLLNER, R. **Kinetic studies on the mechanism of the penicillin amidase-catalysed synthesis of ampicillin and benzylpenicillin.** Hoppe-Seyler's Physiol. Chemical. Vol 365, pp. 1435-1443, 1984.
- KIM, G.M. e LEE, S.B. **Effect of organic solvents on penicillin acylase-catalyzed reactions: interaction of organic solvents with enzymes.** Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic. Vol. 1, pp. 181-190, 1996(b).
- KIM, G.M. e LEE, S.B. **Penicillin acylase-catalyzed synthesis of β -lactam antibiotics in water-methanol mixtures: effect of cosolvent content and chemical nature on reaction rates and yields.** Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic. Vol. 1, pp. 201-211, 1996(a).
- LEHNINGER, L.A.; NELSON, L.D. AND COX, M.M. **Princípios de Bioquímica.** Segunda edição. Editora Sarvier, 1995
- LESER, E. W.; ASENJO, A. J. **Protein recovery, separation and purification, selection of optimal techniques using an expert system,** Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. Vol. 89, n^o 1, pp. 99-109, 1994.
- LOUWRIER, A.; KNOWLEST, C. J. **The aim of industrial enzymic amoxyllin production: characterization of a novel carbamoylase enzyme in the form of a crude, cell-free extract,** Biotechnol. Appl. Biochemistry. Vol. 25, pp. 143-149, 1997.

- MARGOLIN, A. L.; SVEDAS, V.K.S.; BEREZIN, I.V. **Substrate Specificity of Penicillin Amidase from *Escherichia coli***. *Biochimica et Biophysica Acta*. Vol. 616, pp. 283-289, 1980.
- MARZO, A. e DAL BO, L. **Chromatography as an analytical tool for selected antibiotic classes: a reappraisal addressed to pharmacokinetic applications**. *Journal of Chromatography A*. Vol. 812, pp. 17-34, 1998.
- McDOUGALL, B.; DUNNIL, P. e LILLY, M.D. **Enzymic acylation of 6-aminopenicillanic acid**. *Enzyme and Microbial Technology*. Vol. 4, pp. 114-115, 1982.
- McGREGOR, W. C. **Membrane Separations in Biotechnology**, New York, Marcel Dekker, 1986.
- MOODY, H.; HOGENBOOM, A.; LANGE, B.; HEEMSKERK, D.; DOOREN, T.V.; BOESTEN, W.; ROOS, E. **Enzymatic Production of CephadroxyI**. Abstract book of 10th European Congress on Biotechnology, CAT 12, Madrid, Spain, 8-11 July, 2001.
- MULDER, M. **Basic Principles of Membrane Technology**, The Netherlands, Kluwer Academic Publishers, 1991.
- NATHWANI, D. e WOOD, M.J. **Penicillins: A current review of their clinical pharmacology and therapeutic use**. *Drugs*. Vol. 45, n^o 6, 866-894, 1993.
- NÓBREGA, R. **Processos de Separação com Membranas e Suas Aplicações em Biotecnologia**, ENZITEC, Rio de Janeiro, 1995.
- OSPINA, S. **Characterization and use of a penicillin acylase biocatalyst**. *J.Chem. Biotechnology*. 53, 205-214, 1992.
- OSPINA, S.; BARZANA, E.; RAMÍREZ, O.T.AND LÓPEZ-MUNGUÍA, A. **Effect of pH in the synthesis of ampicillin by penicilli acylase**. *Enzyme. Microb. Technology*. Vol. 19, pp. 462-469, 1996 (a).
- PELCZAR Jr., M.J.; CHAN, E.C.S. e KRIEG, N.R. **Microbiologia: Conceitos e Aplicações**, 2ed. Makron Books, São Paulo, 1996.
- PEREIRA, G.H.A. **Estudo da Imobilização Multipontual da Penicilina G Acilase em Sílica Ativada com Grupos Glioxil**. São Carlos, UFSCar, 1994.

- RUDOLPH, E.S.J.; ZOMERDIJK, M.; LUYBEN, K.CH.A.M.; VAN DER WIELEN, L.A.M. **Correlating the phase behaviour of semi-synthetic antibiotics and their precursors in water + 1-butanol mixtures.** Fluid Phase Equilibrium. Vol. 160, nº158, pp. 903-912, 1999.
- SAVIDGE, T.A. **Enzymatic conversions used in the production of penicillins and cephalosporins.** Biotechnology of Industrial Antibiotics. Nova Iorque, Marcel Dekker, 1984.
- SCHROËN, C.G.P.H.; NIERSTRASZ, V.A.; KROON, P.J.; BOSMA, R.; JANSSEN, A.E.M.; BEEFTINK H.H. e TRAMPER, J. **Thermodynamically controlled synthesis of β -lactam antibiotics. Equilibrium concentrations and side-chain properties.** Enzyme and Microbial Technology. Vol 24, pp. 498-506, 1999.
- SHULEN, L.M. AND KARGI, F. **Bioprocess Engineering – Basic Concepts.** Prentice Hall, 1992
- SLEJKO, L.F. **Adsorption Technology.** Marcel Dekker, 1985.
- SMITH, A. **Cephalosporins.** In: Moo-Young, M., Comprehensive Biotechnology, Pergamon Press. Vol 3, pp. 165-185, 1985.
- SNYDER L.R.; KIRKLAND, J.J.; GLAJCH, J.L. **Practical HPLC Method Development.** John Wiley & Sons, 1997.
- TOMASZ, A. **The mechanism of the irreversible antimicrobial effects of penicillins :how the beta-lactam antibiotics kill and lyse bacteria.** Ann. Rev Microbial. Vol. 33, pp. 113-137, 1979.
- SVEDAS, V.K., MARGOLIN, A.L. E BEREZIN, I.V. **Enzymatic synthesis of β -lactam antibiotics: a thermodynamic background.** Enzyme and Microbial Technology. vol. 2, pp. 138-144, 1980b.
- SVEDAS, V.K., MARGOLIN, A.L.; BORISOV, I.L. e BEREZIN, I.V. **Kinetics of enzymatic synthesis of benzylpenicillin.** Enzyme and Microbial Technology. Vol. 2, pp. 313-317, 1980a.
- VOSER, W. **Isolation of Hydrophilic Fermentation Products by Adsorption Chromatography.** J. Chem. Tech. Biotechnology. Vol. 32, pp. 109-118, 1982.

- YOUSHKO, M.I.; VAN LANGEN, L.M.; DE VROOM E.; MOODY, H.M.; VAN RANTWIJK, F.; SHELDON, R.A.; ŠVEDAS, V. K. **Penicillin acylase-catalyzed synthesis of ampicillin in “aqueous solution-precipitate” systems. High substrate concentration and supersaturation effect.** J. Molec.Catal.B: Enzymatic. Vol. 10, pp. 509-511, 2000.
- ZHU, H., GRANT, D.J.W. **Influence of water activity in organic solvent + water mixtures on the nature of the crystallizing drug phase. 2. Ampicillin.** International Journal of Pharmaceutics. Vol. 130, pp. 33-43, 1996.