

Universidade Federal de São Carlos
Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química

*Purificação da Cefamicina C por processo de
adsorção em coluna de leito fixo*

LILIANE MACIEL DE OLIVEIRA
ORIENTADOR: PROF. DR. MARLEI BARBOZA PASOTTO

São Carlos – SP

2013

Universidade Federal de São Carlos
Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química

*Purificação da Cefamicina C por processo de
adsorção em coluna de leito fixo*

LILIANE MACIEL DE OLIVEIRA

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 Pesquisa e Desenvolvimento de Processos Químicos.

ORIENTADOR: PROF. DR. MARLEI BARBOZA PASOTTO

São Carlos – SP

2013

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

O48pc

Oliveira, Liliâne Maciel de.

Purificação da cefamicina C por processo de adsorção em coluna de leito fixo / Liliâne Maciel de Oliveira. -- São Carlos : UFSCar, 2013.

110 f.

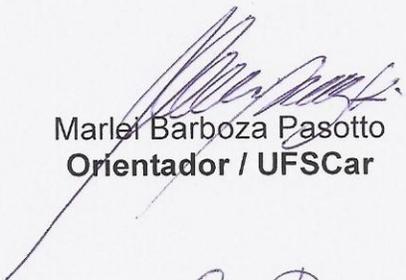
Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2013.

1. Engenharia bioquímica. 2. Purificação. 3. Cefamicina C. 4. Troca iônica. 5. Adsorção. 6. Colunas de leito fixo. I. Título.

CDD: 660.63 (20^a)

MEMBROS DA BANCA EXAMINADORA DA TESE DE DOUTORADO DE **LILIANE MACIEL DE OLIVEIRA**, APRESENTADA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS EM 29 DE ABRIL DE 2013.

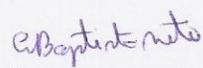
BANCA EXAMINADORA:



Marlei Barboza Pasotto
Orientador / UFSCar



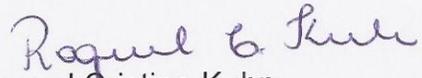
Alberto Colli Badino Junior
UFSCar



Álvaro de Baptista Neto
VERDARTIS



Eloizio Julio Ribeiro
UFU



Raquel Cristine Kuhn
UFSM

*Aos meus pais, Geraldo e Vanda,
pelo apoio as minhas decisões,
pelo incentivo e confiança na minha capacidade
e pela presença em todos os momentos importantes.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, sempre presente em minha vida – a fortaleza nos momentos difíceis, o consolo nos dias tristes, a luz nos momentos de dúvida, e alegria e esperança nos dias de felicidade.

Agradeço à minha família, que investiu e acreditou em mim e que renunciou a muitas coisas para me oferecer a melhor educação possível. Obrigada pela confiança e pelo apoio em todas as minhas decisões, mesmo estas não sendo a vontade de vocês. Agradeço pela pessoa que sou hoje, por tudo o que conquistei e por todas as perspectivas que tenho daqui para frente, pois vocês são grandes responsáveis por isso e também fazem parte das minhas conquistas.

Agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. Marlei Barboza Pasotto, pela orientação durante o desenvolvimento da tese, pela confiança no meu trabalho e por todo aprendizado profissional.

Agradeço ao Prof. Dr. Carlos Osamu Hokka pela confiança em minha capacidade e pelo incentivo dado no início do doutorado, e por abrir as portas do laboratório de Engenharia Bioquímica do DEQ/UFSCar, onde permaneci durante toda minha pós-graduação.

Agradeço ao Prof. Dr. Alberto Colli Bandino Jr., pela ajuda no desenvolvimento do trabalho e pelas sugestões dadas à tese.

Agradeço ao meu amigo e colega de laboratório Guilherme pela disponibilidade e boa vontade em ajudar no desenvolvimento de várias etapas do trabalho.

Agradeço à Carol por ceder os caldos de cultivo que produziu durante o seu doutorado tornando possível a realização do trabalho.

Agradeço muito aos amigos de laboratório, que também fizeram parte deste trabalho, seja pela ajuda constante no laboratório ou pela companhia e brincadeiras nos momentos de descontração: Luciana, Guilherme, Maritza, Cecília, Carol Bellão, Carol Mendes, Mateus, Fernanda, Jorge, Álvaro, Amadeus.

Agradeço às amigas-irmãs e aos amigos sempre presentes na minha vida: Renata, Luciano, Bruna, Pricila, Ariane, Isabela, Lívia, Maisa, Hugo, Cris e Lívia Maciel.

“Tudo posso naquele que me fortalece” Filipenses 4, 13.

RESUMO

As cefalosporinas são antibióticos β -lactâmicos muito utilizados no tratamento de infecções bacterianas. Dentro do grupo, a cefamicina C (cefC) se destaca devido a sua maior resistência à ação das β -lactamases bacterianas e ao seu maior espectro de ação contra patógenos Gram-negativos. Ela é produzida pelas bactérias *Nocardia lactamdurans* e *Streptomyces clavuligerus*, geralmente em cultivos submersos. Na literatura, as informações existentes sobre os processos de purificação deste antibiótico estão disponíveis apenas em patentes ou em artigos publicados em décadas passadas. Sendo um composto que é matéria-prima para produção de antibióticos semissintéticos de grande importância clínica e comercial, e devido à falta de informações fundamentadas cientificamente sobre os processos de separação e purificação deste antibiótico, surgiu a motivação para o desenvolvimento desta tese. Assim, o objetivo deste trabalho foi estudar a purificação da cefC produzida por *S. clavuligerus*, utilizando o processo de adsorção e troca iônica em colunas de leito fixo. As técnicas de adsorção e troca iônica apresentam-se como uma boa estratégia para purificação da cefC devido à natureza anfótera da molécula do antibiótico, que possui cargas positivas ou negativas dependendo do pH do meio, e ao núcleo bicíclico em sua estrutura, que permite a interação com estruturas hidrofóbicas. Como não há o padrão da cefC disponível no mercado, neste estudo trabalhou-se apenas com o caldo de cultivo. Os adsorventes avaliados foram as resinas neutras Amberlite XAD4 e Amberlite XAD16 e a resina de troca iônica Q Sepharose XL. Inicialmente, foram realizados experimentos em coluna de troca iônica com a resina QXL. Os resultados destes ensaios mostraram que a variação da vazão no intervalo de 2,5 mL/min a 7,5 mL/min não alterou as eficiências de recuperação do produto e de utilização do leito, nem interferiram na eluição dos compostos bioativos. A eluição no modo isocrático com solução de NaCl 1% (m/v) possibilitou a separação da cefC de outro(s) composto(s) com atividade antimicrobiana presentes no caldo, mas não identificados, e promoveu uma recuperação do antibiótico em um tempo menor de processo e em um volume menor de solução que a eluição com NaCl 0,1%. Após análise por espectrometria de massas, com ionização feita por ESI no modo positivo, observou-se que o processo de troca iônica seguido da adsorção em cartucho de SPE C18 foi capaz de separar a cefC de composto(s) com a razão m/z correspondente à lisina, e diminuir a concentração de contaminantes presentes no caldo cujas moléculas apresentaram, após ionização, razão m/z correspondentes à das moléculas de penicilina N, desacetilcefalosporina C e desacetoxicefalosporina C. Finalizados os experimentos de troca iônica, iniciaram-se os estudos de adsorção utilizando as resinas neutras. Os primeiros experimentos consistiram na determinação de isotermas de adsorção da cefC nas resinas XAD4 e XAD16, avaliando a influência do pH e da temperatura no equilíbrio de adsorção. Os resultados mostraram que o pH do caldo teve drástica influência na adsorção, sendo que a melhor condição observada foi no valor de pH 2,6 à 15°C. Os ensaios cinéticos mostraram que o equilíbrio é atingido mais rapidamente na resina XAD16. A estimativa dos parâmetros cinéticos intrínsecos e de transferência de massa retornaram valores maiores para esta resina. O processo de adsorção em coluna com a resina XAD4, quando a alimentação da coluna consistiu do caldo ultrafiltrado ou clarificado e a eluição foi feita com as soluções de EtOH 1% ou 5% (v/v), não levou à separação da cefC dos contaminantes que

foram monitorados nos ensaios. Mas quando a alimentação foi feita com uma fração pré-purificada, oriunda da troca iônica, adicionada de cefalosporina C, foi possível obter a separação dos dois antibióticos. A cefalosporina C foi adicionada para simular a presença de alguns contaminantes presentes no caldo de cultivo – a desacetilcefalosporina C e desacetoxicefalosporina C. Como estes contaminantes estão em concentrações muito baixas e não existem os padrões comerciais disponíveis para serem adquiridos, nem metodologia analítica para quantificá-los, optou-se por adicionar cefalosporina C, cuja estrutura química é bem similar à dos contaminantes, existe o padrão comercial para ser adquirido e possui um método de quantificação. Os experimentos em coluna com a resina XAD16 mostraram resultados similares aos experimentos com a resina XAD4, nos quais também foi observada a separação entre a cefC e a cefalosporina C. Após análise dos momentos dos picos cromatográficos, verificou-se que a cefC apresentou tempos de retenção médios menores na resina XAD16 e a dispersão dos picos foi menor. Desta forma, foi obtida uma fração mais concentrada em cefC nos ensaios em coluna com esta resina do que com a resina XAD4. Portanto, pôde-se constatar pelo processo de purificação estudado que as técnicas de adsorção e troca iônica mostraram-se eficientes na purificação da cefC em relação a contaminantes difíceis de serem separados.

ABSTRACT

Cephalosporins are β -lactam antibiotics which are widely used in the treatment of bacterial infections. Within this group, cephamycin C (CefC) stands out from the others cephalosporins antibiotics due to its greater resistance to β -lactamases enzymes and its broader spectrum of action against Gram-negative pathogens. It is produced by the bacteria *Nocardia lactamdurans* and *Streptomyces clavuligerus*, usually in submerged fermentation. In the literature, the available information about the purification processes of this antibiotic are restricted to patents or papers published in the past decades. As cefC is the raw material for the production of important semi-synthetic antibiotics and due to the lack of scientifically substantiated information about its separation and purification processes, the motivation for the development of this thesis has arisen. Then, the aim of this thesis was to study the purification process of CefC produced by *S. clavuligerus*, by using the processes of adsorption and ion exchange in fixed bed columns. The techniques of adsorption and ion exchange present themselves as good strategies for CefC purification due to the amphoteric nature of the antibiotic molecule, which has positive or negative charges depending on the environmental pH, and the bicyclic nucleus in its structure, which allows the interaction with hydrophobic structures. As there is no chemical standard of cefC available on the market, in this study we have only used culture broth containing this antibiotic. The adsorbents evaluated were the neutral resins Amberlite XAD4 and Amberlite XAD16 and the anionic resin Q Sepharose XL. At first, ion exchange column experiments using the resin QXL were carried out. The results showed that the variation of the flow rate in the range of 2.5 mL/min to 7.5 mL/min did not affect the efficiencies of product recovery nor of bed utilization, and it did not interfere with the bioactive compounds' elution. The isocratic elution modes using 0.1% or 1% NaCl (w / v) were able to separate cefC from other (s) compound (s) with antimicrobial activity present in the broth, which were not identified. But the use of 1% NaCl solution promoted the antibiotic recovery in a shorter process time and smaller volume than using 0.1 % NaCl solution. After analysis by mass spectrometry, carried out by ESI ionization in the positive mode, it was observed that the ion exchange process with QXL resin followed by adsorption on a C18 SPE cartridge were able to separate cefC from compound (s) whose molecules after ionization acquired m/z ratios corresponding to the lysine's molecule, and they also reduced the concentration of contaminants with m/z ratios corresponding to the molecules of penicillin N, deacetylcephalosporin C and deacetoxycephalosporin C. As the ion exchange studies were done, the adsorption studies using the neutral resins were initiated. At first, adsorption isotherms of cefC on XAD4 and XAD16 resins were obtained, and the effects of pH and temperature in the adsorption equilibrium were evaluated. The results showed that the broth pH had strong influence on the adsorption and the best condition was observed at pH 2.6 at 15° C. The kinetic experiments have shown that equilibrium is reached more quickly on the resin XAD16. Estimation of intrinsic kinetic parameters and mass transfer coefficients returned higher values for this resin. The column adsorption processes with XAD4 resin, when the column feed consisted of the ultrafiltered or clarified broth and the elution solutions were 1% or 5% (v/v) EtOH solutions, did not lead to separation of cefC from contaminants that were monitored in the experiments. But when the feed consisted of a pre-

purified fraction, obtained in the ion exchange column with QXL resin, added with cephalosporin C, it was possible to separate the two antibiotics. Cephalosporin C was added to simulate the presence of some contaminants in the culture broth - deacetylcephalosporin C and deacetoxycephalosporin C. As these contaminants are in very low concentrations and there are not commercial chemical standards available to purchase, neither an analytical methodology to quantify them, it was decided to add cephalosporin C, whose chemical structure is very similar to the contaminants, the commercial standard is commercially available and there is a quantification method to determinate it. The column experiments with resin XAD16 showed similar results to the experiments with resin XAD4, in which it was also observed the separation of cefC from cephalosporin C. The moment analysis of the chromatographic peaks showed that cefC average retention times and peak dispersions were smaller in the column assays with XAD16 than with XAD4. Thus, a more concentrated fraction containing cefC was obtained in the column experiments with XAD16 resin. Therefore, it was demonstrated by the purification processes studied that the techniques of adsorption and ion exchange were effective in the purification of cefC in relation to contaminants that are difficult to separate.

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1- Estruturas das cefamicinas A, B e C, e 7 α -metoxicefalosporina. 1- Grupo metoxila; 2- Anel β -lactâmico; 3- Anel di-hidrotizina	4
Figura 2.2 – Fórmula estrutural da Cefalosporina C	5
Figura 2.3- Representação esquemática da troca iônica na superfície de um adsorvente catiônico. A figura mostra a troca do adsorbato representado por um triângulo pelo adsorbato em forma de círculo, indicando que este último apresenta maior afinidade pelo adsorvente que o primeiro.	10
Figura 2.4 - Representação esquemática da adsorção específica ou por afinidade.	11
Figura 2.5 - Ilustração do transporte de massa em um sistema de adsorção	16
Figura 2.6 – Perfis de concentração do soluto na fase fluida em colunas de leito fixo. (A) Variação da concentração com o tempo e ao longo da posição no leito; (B) Representação de uma curva de ruptura, sendo C a concentração na saída da coluna.....	18
Figura 2.7 – Diagrama esquemático de um processo de adsorção contínuo em carrossel com quatro zonas de operação.....	19
Figura 2.8 - (A) Reator de mistura encamisado; (B) Sistema contínuo de adsorção formado por dois reatores de mistura.....	20
Figura 3.1 - Fluxograma dos processos de purificação utilizados.....	35
Figura 3.2 - Aparato experimental utilizado nos experimentos em coluna de leito fixo.....	38
Figura 3.3 - Reator de mistura utilizado para retirada de contaminantes de caldo de cultivo ultrafiltrado.	41
Figura 3.4 - Sistema de vasos comunicantes utilizados na eluição em modo gradiente linear	45
Figura 3.5 Representação teórica de uma curva de ruptura em coluna de leito fixo.....	47
Figura 4.1 - Adsorção da cefamicina C e contaminantes na resina XAD4 em reator de mistura, à 20°C, pH 6,6.	51
Figura 4.2 - Perfil de adsorção e eluição de compostos com atividade antibacteriana e alguns contaminantes presentes no caldo de cultivo, em coluna de leito fixo com a resina Q Sepharose XL, a uma vazão de alimentação e eluição de 5,0 mL/min, 20°C, caldo pH 6,8.	52

- Figura 4.3 - Curvas de ruptura para a cefamicina C em coluna de leito fixo com resina QXL, em três diferentes vazões de operação.....53
- Figura 4.4 - Perfis de concentração da cefamicina C, contaminantes e compostos com atividade bactericida na saída da coluna empacotada com a resina QXL, durante a alimentação e parte da lavagem da coluna, nas vazões (A) 2,5 mL/min; (B) 5mL/min; (C) 7,5 mL/min.....53
- Figura 4.5 - Perfil de adsorção e eluição de compostos com atividade antibacteriana e alguns contaminantes presentes no caldo de cultivo, em coluna de leito fixo com a resina Q Sepharose XL, a uma vazão de alimentação e eluição de 2,5 mL/min, 20°C.....55
- Figura 4.6 - Perfil de adsorção e eluição de compostos com atividade antibacteriana e alguns contaminantes presentes no caldo de cultivo, em coluna de leito fixo com a resina Q Sepharose XL, a uma vazão de alimentação e eluição de 7,5 mL/min, 20°C.....56
- Figura 4.7 - Espectro de absorção da banda de cefamicina C na análise por CLAE entre os comprimentos de onda de 190 a 800nm.....56
- Figura 4.8 - Perfis de adsorção e eluição da cefamicina C em coluna de leito fixo empacotada com a resina Q Sepharose XL, em duas concentrações diferentes de sal na eluição, à 20°C, vazão 5 mL/min. O primeiro pico representa a cefamicina C não adsorvida na alimentação, devido à saturação da coluna, já o segundo representa a cefamicina C desorvida na eluição.....57
- Figura 4.9 - Perfil de adsorção e eluição de compostos com atividade antibacteriana e alguns contaminantes presentes no caldo de cultivo, em coluna de leito fixo com a resina Q Sepharose XL, a uma vazão de alimentação e eluição de 5,0 mL/min, 20°C.....57
- Figura 4.10 – Perfil de compostos com bioatividade e contaminantes em coluna de troca iônica com a resina QXL.....60
- Figura 4.11- Perfil de concentração da cefamicina C durante aplicação e eluição da fração da QXL em cartucho SPE C18.....60
- Figura 4.12 – Cromatogramas obtidos a 254 nm após análise quantitativa da cefamicina C das frações coletadas durante a extração em fase sólida. (A) Fração 12; (B) Fração 13; (C) Fração 14.....61
- Figura 4.13– Cromatogramas obtidos após injeção do caldo calrificado no sistema LC-MS: (A) ultravioleta (254nm); (B) íons totais; (C-H) pico base. Os cromatogramas de pico

base correspondem às seguintes moléculas: (C) cefamicina C, (D) penicilina N, (E) desacetilcefalosporina C, (F) desacetoxicefalosporina C, (G) lisina.....	63
Figura 4.14– Cromatogramas obtidos após injeção da fração 12 no sistema LC-MS: (A) íons totais; (B-G) pico base. Os cromatogramas de pico base correspondem às seguintes moléculas: (B) cefamicina C, (C) penicilina N, (D) desacetilcefalosporina C, (E) desacetoxicefalosporina C, (F) lisina.	64
Figura 4.15 - Isotermas de adsorção da cefamicina C em XAD4 à 20°C, em diferentes valores de pH.	65
Figura 4.16 - Estrutura molecular da Cefamicina C. Os grupos funcionais ionizáveis estão destacados pelos círculos. 1) Grupos carboxílicos; 2) Grupos amino.....	66
Figura 4.17- Isotermas de adsorção da Cefamicina C na resina XAD4 em diferentes temperaturas. Os símbolos representam os pontos experimentais e a linha contínua o ajuste ao modelo de equilíbrio de adsorção de Langmuir ou Linear. A) pH ~2,6, ajuste ao modelo de Langmuir; B) pH ~4,6, ajuste ao modelo linear; C) pH~6,6, ajuste ao modelo linear e de Langmuir.....	67
Figura 4.18 Isotermas de adsorção da Cefamicina C na resina XAD16 em diferentes temperaturas. Os símbolos representam os pontos experimentais e a linha contínua o ajuste ao modelo de equilíbrio de adsorção de Langmuir ou linear. A) pH ~2,6, ajuste ao modelo de Langmuir; B) pH ~4,6, ajuste ao modelo linear; C) pH~6,6, ajuste ao modelo de linear.	70
Figura 4.19 - Afinidade de adsorção da cefamicina C nas resinas XAD4 (A) e XAD16 (B). 73	
Figura 4.20 – Representação de duas isotermas hipotéticas com o mesmo q_m mas valores de K_D diferentes.....	75
Figura 4.21 – Simulações de isotermas para as resinas XAD4 e XAD16 utilizando o modelo de Langmuir e os parâmetros q_m e K_D obtidos após ajuste dos dados experimentais à 15°C.....	76
Figura 4.22 - Cinética de adsorção e dessorção da cefamicina C em reator de mistura nas resinas XAD4 e XAD16. Temperatura 20°C, dessorção EtOH 15%. C e C_0 são as concentrações de cefamicina C na saída da coluna e na alimentação, respectivamente. Os símbolos fechados representam a etapa de adsorção e os símbolos abertos a etapa de dessorção.	77

Figura 4.23 - Ajuste do modelo de cinética de adsorção (linha contínua) aos dados experimentais (pontos) para as resinas XAD4 e XAD16.....	81
Figura 4.24 - Perfis de adsorção da cefamicina C obtidos durante a alimentação da coluna empacotada com a resina Amberlite XAD4.....	83
Figura 4.25 - Perfil de adsorção e eluição da cefamicina C presente em caldo de cultivo, em coluna empacotada com a resina Amberlite XAD4, a uma vazão de alimentação e eluição de 5,0 mL/min, 20°C, caldo pH 3,42.....	87
Figura 4.26 - Perfil de adsorção e eluição da cefamicina C presente em caldo de cultivo, em coluna empacotada com a resina Amberlite XAD4, a uma vazão de alimentação e eluição de 5,0 mL/min, 20°C, caldo pH 2,81.....	87
Figura 4.27- Perfil de adsorção e eluição da cefamicina C presente em caldo de cultivo, em coluna empacotada com a resina Amberlite XAD4, a uma vazão de alimentação e eluição de 5,0 mL/min, 20°C, caldo pH 2,81.....	88
Figura 4.28 - Perfil de adsorção e eluição de compostos com atividade antibacteriana presentes na fração 1, em coluna de leito fixo com a resina Amberlite XAD4, a uma vazão de alimentação e eluição de 5,0 mL/min, 20°C, caldo pH 2,68.....	89
Figura 4.29- Perfil de adsorção e eluição da fração 1 adicionada de cefalosporina C em coluna de leito fixo empacotada com a resina Amberlite XAD4, a uma vazão de alimentação e eluição de 5,0 mL/min, 20°C, caldo pH 2,68. Eluição em gradiente linear de solução de EtOH.....	91
Figura 4.30 - Perfil de adsorção e eluição da fração 1 adicionada de cefalosporina C em coluna de leito fixo empacotada com a resina Amberlite XAD4, a uma vazão de alimentação e eluição de 5,0 mL/min, 20°C, caldo pH 2,68. Eluição em gradiente degrau de solução de EtOH.....	92
Figura 4.31 – Perfil de adsorção e eluição da cefamicina C e compostos com atividade antibacteriana presentes no caldo ultrafiltrado, em coluna de leito fixo com a resina Amberlite XAD16, a uma vazão de alimentação e eluição de 5,0 mL/min, 20°C, caldo pH 2,68.....	93
Figura 4.32 - Perfil de adsorção e eluição da cefamicina C e compostos com atividade antibacteriana presentes na fração 1, em coluna de leito fixo com a resina Amberlite XAD16, a uma vazão de alimentação e eluição de 5,0 mL/min, 20°C, caldo pH 2,68....	94

Figura 4.33 - Perfil de adsorção e eluição da cefamicina C, cefalosporina C e compostos com atividade antibacteriana presentes na fração 1 adicionada de cefalosporina, em coluna de leito fixo com a resina Amberlite XAD16, a uma vazão de alimentação e eluição de 5,0 mL/min, 20°C, caldo pH 2,68. 95

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1 - Características das resinas poliméricas neutras Amberlite XAD 4 e XAD 16	29
Tabela 3.2 - Características da resina de troca aniônica Q Sepharose XL	30
Tabela 3.3: Parâmetros de operação dos experimentos de troca iônica em coluna de leito fixo com a resina QXL.....	38
Tabela 3.4: Parâmetros de operação dos experimentos em coluna de leito fixo com a resina XAD4	43
Tabela 3.5 - Parâmetros de operação dos experimentos em coluna de leito fixo com a resina XAD16	44
Tabela 4.1- Parâmetros calculados a partir das curvas de ruptura da cefamicina C em coluna de leito fixo, com a resina Q Sepharose XL, obtidas nos experimentos CQ1, CQ2 e CQ3.	54
Tabela 4.2 – Fatores de recuperação da cefamicina C nos processos em coluna com a resina QXL.....	58
Tabela 4.3 – Compostos monitorados nas análises por espectrometria de massas e as respectivas razões m/z	63
Tabela 4.4 - Parâmetros do modelo de Langmuir ajustados para as isotermas de adsorção da cefamicina C em XAD 4, em diferentes valores de pH e temperaturas.	69
Tabela 4.5 - Parâmetros do modelo linear ajustados para as isotermas de adsorção da cefamicina C em XAD4, em diferentes valores de pH e temperaturas.	69
Tabela 4.6 - Parâmetros do modelo de Langmuir ajustados para as isotermas de adsorção da cefamicina C em XAD 16, em diferentes valores de pH e temperaturas.	71
Tabela 4.7 - Parâmetros do modelo linear ajustados para as isotermas de adsorção da cefamicina C em XAD16, em diferentes valores de pH e temperaturas.	71
Tabela 4.8 - Valores de afinidade de adsorção para a cefamicina C em diferentes valores de pH e temperatura	73
Tabela 4.9: Valores de q_m/K_D calculados para as resinas XAD 4 e XAD 16, nas condições de pH próximas a 2,6.....	75

Tabela 4.10 - Parâmetros calculados e estimados a partir do modelo cinético de primeira ordem para adsorção da cefamicina C em reator de mistura nas resinas XAD4 e XAD16	79
Tabela 4.11 - Parâmetros de transferência de massa e cinética intrínseca para adsorção da cefamicina C em reator de mistura.	81
Tabela 4.12 - Parâmetros calculados a partir das curvas de ruptura da cefamicina C em coluna de leito fixo, para a resina XAD4	84
Tabela 4.13 - Valores dos momentos e eficiências de separação calculados para os picos da cefamicina C e o pico correspondentes à absorvância no $\lambda=310$ nm nos experimentos em coluna com as resinas XAD4 e XAD16.	96
Tabela 4.14 - Valores dos momentos e eficiências de separação calculados para os picos da cefamicina C e da cefalosporina C nos experimentos em coluna com as resinas XAD4 e XAD16	97
Tabela 4.15 - Fatores de recuperação da cefamicina C totalmente separada da cefalosporina C nos ensaios em coluna com as resinas XAD4 e XAD16.	98

NOMENCLATURA

- a: parâmetro do modelo de isoterma BET e representa o coeficiente de equilíbrio para a monocamada (relação entre a adsorção e dessorção)
- A_H : diâmetro do halo de inibição da amostra de maior concentração no bioensaio quantitativo
- A_L : diâmetro do halo de inibição da amostra de menor concentração no bioensaio quantitativo
- b: parâmetro do modelo de isoterma BET e representa o coeficiente de equilíbrio para todas as camadas acima da primeira monocamada
- BET: modelo de isoterma de adsorção e representa a abreviação de Brunauer, Emmet, e Teller, nomes dos pesquisadores que criaram o modelo
- BPC: “Base peak chromatogram”, ou cromatograma de pico base.
- C: concentração de cefamicina C na fase líquida
- C^* : concentração de cefamicina C na fase líquida, no equilíbrio
- C_A : concentração de cefamicina C na fase líquida
- C_{amostra} : concentração de cefamicina C na amostra calculada pelo bioensaio quantitativo
- C_B : concentração do complexo CefR
- CC: caldo clarificado, que corresponde ao caldo ultrafiltrado após adsorção na resina XAD4 para retirada de contaminantes coloridos
- C_{cont} : concentração de contaminantes no caldo
- Cef ou CefC: cefamicina C
- CefR: complexo da cefamicina C adsorvida no sítio ativo da resina
- C_{EtOH1} : no modo de eluição em gradiente linear é a concentração de etanol no béquer com maior concentração de etanol
- C_{EtOH2} : no modo de eluição em gradiente linear é a concentração de etanol no béquer com menor concentração de etanol, cuja solução é bombeada para a coluna
- C_i : concentração do adsorbato na fração i
- C_L : concentração de cefamicina C na fase líquida no reator de mistura

C_M :	parâmetro do modelo de isoterma BET e representa a quantidade adsorvida em relação à massa total de adsorvente para cobertura completa da monocamada
C_S :	concentração do adsorbato na fase líquida
C_0 :	concentração inicial de cefamicina C no caldo ou na fração
C_{0cont} :	concentração inicial de contaminantes no caldo
C18:	fase estacionária octadecilsilano
D_{ef} :	difusividade da cefamicina C nos poros da resina
DO:	densidade óptica
ES:	eficiência de separação entre dois componentes
EtOH:	etanol
F:	vazão de eluição da coluna
FC:	fator de concentração
FP:	fator de purificação
FR:	fator de recuperação
F1:	fração contendo cefamicina C coletada durante eluição da coluna de troca iônica com resina QXL
H_b :	altura do leito utilizada até o ponto de ruptura
H_t :	altura total do leito da coluna
H_{unb} :	altura não utilizada do leito até o ponto de ruptura
K:	constante do modelo de isoterma linear
k_{ad} :	constante cinética intrínseca de adsorção.
K_D :	parâmetro do modelo da isoterma de Langmuir e corresponde à razão entre as constantes de dessorção e adsorção
k_{des} :	constante cinética intrínseca de dessorção
K_E :	constante de equilíbrio de adsorção
K_F :	constante do modelo de isoterma de Freundlich

K_R :	constante calculada a partir de K_E e k_2 no modelo cinético de adsorção de primeira ordem
K_S :	coeficiente de transferência de massa da película
k'_1	constante cinética aparente de adsorção
k'_2 :	constante cinética aparente de dessorção
LC-MS:	cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas
m :	massa de resina utilizada no experimento
m/z :	razão massa carga adquirida por uma molécula ou fragmento de molécula após passar por uma fonte de ionização e ou fragmentação em um espectrômetro de massas.
n :	número de moléculas de adsorbato que se ligam a cada sítio ativo do adsorvente
n' :	parâmetro do modelo de isoterma BET e representa o número de camadas incluindo a monocamada
P :	produtividade do processo durante a alimentação da coluna calculada a partir das curvas de ruptura
P_H :	diâmetro do halo de inibição da solução padrão de maior concentração no bioensaio quantitativo
P_L :	diâmetro do halo de inibição da solução padrão de menor concentração no bioensaio quantitativo
$1/n$:	constante do modelo de isoterma de Freundlich
q :	concentração do adsorbato na fase sólida ou quantidade de cefamicina C adsorvida por massa de resina
Q :	vazão de alimentação da coluna
q^* :	concentração de cefamicina C na fase sólida (resina), no equilíbrio
q' :	mmol de cefamicina C adsorvida por m^2 de resina
q'' :	massa de cefamicina C adsorvida por massa de resina calculadas a partir dos dados de curva de ruptura obtidas com a resina Amberlite XAD4
q_b :	quantidade de cefamicina C adsorvida por volume de leite até o ponto de ruptura

q_m :	concentração na fase sólida correspondente à completa cobertura dos sítios disponíveis, ou a capacidade limitante de adsorção. É também um parâmetro do modelo da isoterma Langmuir.
q_t :	quantidade de cefamicina C adsorvida por volume de leito da coluna até a sua saturação
R:	raio da partícula de resina
Res:	sítio ativo da resina disponível para ser adsorvido
SPE:	“solid phase extraction” ou extração em fase sólida
t:	tempo
t_b :	tempo equivalente ao ponto de ruptura da coluna
t_c :	na curva de ruptura é o primeiro instante de tempo em que $C/C_0 \approx 1$
t_i :	tempo no qual a fração i sai da coluna
TIC:	“Total ion chromatogram”, ou cromatograma de íons totais.
t_t :	tempo equivalente para atingir a capacidade total do leito, calculado a partir das curvas de ruptura
t_u :	tempo equivalente a capacidade utilizada ou o tempo no qual o efluente atinge a máxima concentração permitida de soluto, , calculado a partir das curvas de ruptura
UV:	ultravioleta
V:	volume de caldo ou fração alimentados na coluna ou no reator
V_i :	volume da fração i coletada na coluna
VL:	volume de leito da coluna
V_0 :	no modo de eluição em gradiente linear é o volume inicial de solução eluente nos béqueres

Letras gregas

Δ :	operador de variação
ε :	porosidade do sistema

ε_p :	porosidade da resina
θ :	parâmetro calculado no bioensaio quantitativo a partir dos halos de inibição das soluções de amostra e do padrão
μ :	primeiro momento de um pico cromatográfico
ρ_{resina} :	densidade da resina
σ^2 :	segundo momento do pico cromatográfico
ϕ_1 :	eficiência de utilização do leito calculada a partir das curvas de ruptura
ϕ_2 :	eficiência de remoção do soluto ou a eficiência relacionada à capacidade de retenção do soluto no leito calculada a partir das curvas de ruptura

SUMÁRIO

RESUMO	i
ABSTRACT	iii
LISTA DE FIGURAS	v
LISTA DE TABELAS	x
NOMENCLATURA.....	xii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
2.1-Cefamicina C	4
2.2-Separação de produtos biotecnológicos.....	5
2.3- Adsorção e troca iônica na purificação de produtos biotecnológicos	8
2.3.1-Equilíbrios de adsorção.....	11
2.3.2 - Cinética de adsorção e transferência de massa	15
2.3.3- Sistemas de operação	16
2.3.4 - Tipos de adsorventes.....	21
2.4 - Processos de purificação da cefamicina C.....	23
3. MATERIAIS E MÉTODOS	29
3.1 – Materiais	29
3.1.1- Resinas	29
3.1.2 – Cartucho para extração em fase sólida.....	30
3.1.3- Caldo de cultivo	30
3.1.4 – Cefalosporina C.....	30
3.2 – Metodologia analítica	31
3.2.1- Determinação da concentração de cefamicina C.....	31
3.2.2 – Detecção de compostos com atividade antimicrobiana – bioensaio qualitativo.....	33
3.2.3- Determinação da concentração de contaminantes	33

3.2.4- Determinação da concentração de cefalosporina C	33
3.2.5 – Análises de espectrometria de massas	34
3.3- Procedimento experimental	35
3.3.1- Pré-tratamento do caldo de cultivo	35
3.3.2 – Pré-tratamento das resinas	36
3.3.3 – Pré-tratamento do caldo ultrafiltrado e obtenção do caldo clarificado	37
3.3.4- Experimentos de troca iônica em coluna de leito fixo empacotada com a resina Q Sepharose XL	37
3.3.5- Adsorção em cartucho SPE utilizando a fase estacionária C18	39
3.3.6- Experimentos de isotermas de adsorção	39
3.3.7- Experimentos de cinética de adsorção e de dessorção da cefamicina C em reator de mistura	40
3.3.8- Experimentos em colunas de leito fixo empacotadas com a resina Amberlite XAD4 e Amberlite XAD16	42
3.4 – Metodologias de análise dos resultados – parâmetros quantitativos	45
3.4.1 – Fator de purificação	45
3.4.2 – Fator de concentração	46
3.4.3 – Fator de recuperação	46
3.4.4 – Avaliação quantitativa das curvas de ruptura	47
3.4.5 – Determinação dos momentos cromatográficos e eficiências de separação	49
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	51
4.1- Purificação da Cefamicina C em coluna de leito fixo com a resina Q Sepharose XL	51
4.1.1 – Avaliação qualitativa da purificação da cefamicina C por espectrometria de massas após coluna de troca iônica em resina QXL e extração em fase sólida	59
4.2- Isotermas de adsorção da Cefamicina C nas resinas aromáticas Amberlite XAD 4 e Amberlite XAD 16	65
4.3 - Cinéticas de adsorção e dessorção da cefamicina C nas resinas XAD4 e XAD16	76

4.3.1 - Modelo cinético de primeira ordem.....	77
4.3.2 - Modelo cinético baseado no balanço de massa do reator, englobando as resistências à transferência de massa.....	79
4.4 - Purificação da Cefamicina C em coluna de leito fixo na resina Amberlite XAD 4	82
4.4.1- Ensaio em coluna com o caldo de cultivo ultrafiltrado.....	83
4.4.2 - Ensaio em coluna com o caldo de cultivo clarificado	88
4.4.3 - Ensaio em coluna com a fração 1 oriunda da coluna de troca iônica	89
4.5 – Purificação da Cefamicina C em coluna de leito fixo na resina Amberlite XAD 16	92
4.5.1-. Purificação do caldo de cultivo contendo cefamicina C.....	93
4.5.2-. Purificação da cefamicina C presente na fração 1 oriunda da coluna de troca iônica	94
4.6 – Comparação entre os processos em coluna com as resinas XAD4 e XAD16	95
4.7 – Considerações finais	98
5. CONCLUSÕES	100
6. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	103
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	104

1. INTRODUÇÃO

A descoberta e o desenvolvimento dos compostos β -lactâmicos figuram entre uma das mais importantes e vitoriosas descobertas da ciência e tecnologia. O uso de antibióticos na terapia moderna começou com a descoberta acidental de um β -lactâmico por Alexander Fleming, em 1928. Em seus estudos, Fleming observou a inibição do crescimento da bactéria *Staphylococcus aureus* em placas de Petri contaminadas com o fungo *Penicillium chrysogenum*. Essa inibição foi atribuída a uma substância produzida pelo fungo durante o seu crescimento, e três anos mais tarde, o composto foi isolado, caracterizado e denominado de penicilina (BRAKHAGE et al., 2005). A importância desta descoberta está no fato de que a penicilina foi o primeiro grande sucesso do uso de um agente quimioterápico produzido por micro-organismo e levou à criação de uma nova linha de pesquisa no desenvolvimento de antibióticos, como também ao surgimento de um novo império industrial. Seguindo os passos da penicilina, veio a descoberta de outros β -lactâmicos – as cefalosporinas, produzidas pelo fungo *Cephalosporium acremonium*, as cefamicinas, clavamas e carbapenens, produzidos por actinomicetos e outras bactérias Gram-negativas, e β -lactâmicos monocíclicos, produzidos por actinomicetos e bactérias (DEMAIN e ELANDER, 1999; LIRAS 1999).

Os β -lactâmicos são compostos caracterizados pela presença do anel β -lactâmico na estrutura molecular, que lhes confere a atividade antibacteriana. De acordo com a característica do segundo anel ligado ao anel β -lactâmico ou a ausência deste anel, o grupo é dividido em cinco classes: penicilinas, cefalosporinas, carbapenens, clavamas e monobactams (LIRAS e MARTIN, 2006).

Atualmente, os β -lactâmicos representam um dos grupos mais expressivos de medicamentos utilizados no tratamento de doenças bacterianas. As penicilinas, usadas no tratamento de doenças causadas por patógenos Gram-positivos, e as cefalosporinas, utilizadas contra Gram-positivos e Gram-negativos, são os antibacterianos mais utilizados para tratamentos de infecções bacterianas, seguidos das fluoroquinolonas e macrolídeos (HAMAD, 2010). Em 2009, os antibióticos da classe das cefalosporinas foram os maiores em termos de vendas, movimentando US\$11,9 bilhões. Esta classe representou 28% do mercado global de antibióticos e a segunda maior foram as penicilinas de amplo espectro de ação, que no mesmo ano movimentaram US\$7,9 bilhões em vendas, correspondendo a 19% do mercado (HAMAD, 2010).

Devido a importância destes medicamentos, tanto na área da clínica como economicamente, existe um grande interesse acadêmico voltado à pesquisa para desenvolvimento e otimização dos processos de produção, extração e purificação destes compostos do caldo de cultivo. Na literatura encontram-se muitos trabalhos relacionados à produção e purificação da penicilina G, cefalosporina C e ácido clavulânico. Entretanto, existem alguns antibióticos cujas informações são mantidas sob segredo industrial e aquelas disponíveis estão presentes quase que exclusivamente em patentes. Este é o caso da cefamicina C, que foi descoberta em 1972 e desde então apenas patentes (PINES e SEEMON, 1976; WILDMAN E DATTA, 1977; SCHUBERT, 1980; KAWAMURA, SHOJI e MATSUMOTO, 1981; KAMOGASHIRA et al., 1982) e quatro trabalhos foram encontrados na literatura relacionados ao seu processo de purificação (MILLER ET AL., 1972; BUSTAMANTE et al., 2008; RODRIGUEZ, HOKKA E BARBOZA, 2010; BAPTISTA NETO et al., 2012).

A cefamicina C pertence à classe das cefalosporinas e é produzida pelos actinomicetos *Streptomyces clavuligerus* e *Nocardia lactamdurans*. Atualmente, existem poucos grupos de pesquisa que trabalham com o desenvolvimento de processos de produção e purificação da cefamicina C. E pelo que se tem conhecimento, apenas o grupo de Engenharia Bioquímica do DEQ/UFSCar realiza pesquisas relacionadas à extração e purificação da cefamicina C de caldos de cultivo. Devido a esta lacuna existente na literatura, pesquisadores de diferentes instituições de ensino e pesquisa no Brasil se reuniram em um grande projeto intitulado “Produção e purificação de ácido clavulânico, cefamicina C e outros metabólitos bioativos de *Streptomyces*”, no qual estavam inseridos professores e pesquisadores do grupo de Engenharia Bioquímica do DEQ/UFSCar. Dentro desta temática principal, já foram realizados trabalhos sobre a produção da cefamicina C em batelada e batelada alimentada (BELLÃO, 2013) e sobre processos de purificação empregando a microfiltração, ultrafiltração, processos de adsorção e troca iônica (BUSTAMANTE et al., 2008; RODRIGUEZ, 2011). Em relação aos processos de separação e purificação da cefamicina, os estudos realizados disponibilizaram informações importantes, mas ainda falta muito para ser avaliado, como aplicação de outras técnicas de separação, estudo das variáveis do processo e determinação das melhores condições de operação.

Assim, dando continuidade aos trabalhos já desenvolvidos, este trabalho de doutorado teve como objetivo avaliar a extração e purificação da cefamicina C de caldos de cultivo fermentados por *S. clavuligerus*, empregando a técnica de adsorção em resinas poliméricas neutras, associada ao processo de troca iônica. A adsorção e a troca iônica foram

escolhidas devido à eficiência das mesmas na extração e purificação de outros antibióticos do caldo de cultivo, como a cefalosporina C, que é um antibiótico de estrutura química muito semelhante à da cefamicina. Além disso, a natureza anfótera da molécula de cefamicina faz com que a troca iônica seja uma técnica interessante para ser aplicada e o núcleo bicíclico em sua estrutura permite a interação com estruturas hidrofóbicas. Acreditou-se que a combinação dessas duas técnicas baseadas em princípios de separação diferentes poderia levar à purificação da cefamicina C em relação a contaminantes de diferentes naturezas, sejam eles iônicos, polares ou apolares. Visando alcançar o objetivo geral, as seguintes etapas foram desenvolvidas:

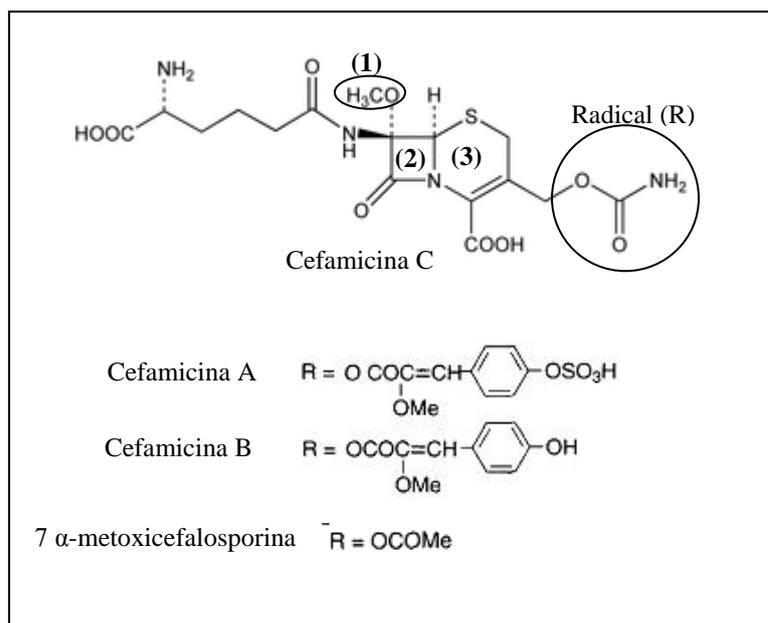
- a) Avaliar a purificação da cefamicina C presente no caldo de cultivo empregando o processo de troca iônica na resina Q Sepharose XL e determinação das curvas de ruptura em diferentes vazões de alimentação;
- b) Estudar do equilíbrio de adsorção da cefamicina C nas resinas poliméricas neutras Amberlite XAD4 e XAD16, em diferentes condições de temperatura e pH;
- c) Estudar da cinética de adsorção da cefamicina C nas resinas XAD4 e XAD16;
- d) Estudar de processos de purificação em colunas de leito fixo empacotadas com as resinas XAD4 e XAD16.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1-Cefamicina C

As cefamicinas constituem uma família de antibióticos pertencentes à classe das cefalosporinas. Como tal, possuem em sua estrutura molecular o núcleo cefem característico das cefalosporinas, formado pelos anéis β -lactâmico (anel de quatro membros) e di-hidrotiazina (anel de seis membros). Ligado ao carbono C7 deste núcleo está presente um grupo metoxila, uma característica particular às cefamicinas. Dependendo do radical ligado ao carbono 3 são classificadas como cefamicina A, B ou C, ou 7 α -metoxicefalosporina (STAPLEY et al., 1972; BAGGALEY et al., 1997) (Figura 2.1).

Figura 2.1- Estruturas das cefamicinas A, B e C, e 7 α -metoxicefalosporina. 1- Grupo metoxila; 2- Anel β -lactâmico; 3- Anel di-hidrotiazina



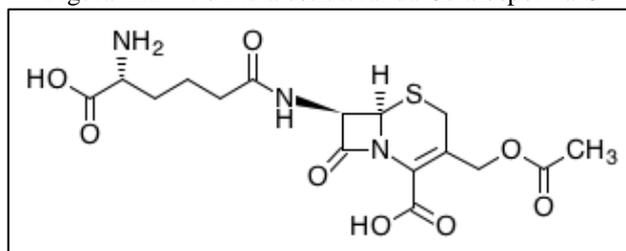
Fonte: Adaptado de Baggaley et al., 1997.

A cefamicina C foi primeiramente descrita por pesquisadores dos laboratórios Lilly e Merck, no início da década de setenta (STAPLEY et al., 1972). Nesta época, o tratamento de doenças utilizando os antibióticos então conhecidos, as penicilinas e cefalosporinas, tornava-se cada vez mais ineficaz devido ao aumento da resistência bacteriana. O principal mecanismo de resistência era a produção β -lactamases. Essas enzimas, produzidas por algumas bactérias patogênicas, clivam o anel β -lactâmico do antibiótico, liberando um composto sem atividade bactericida. Objetivando encontrar soluções para o problema, pesquisadores de várias partes do mundo engajaram-se na procura por novos

antibióticos que fossem mais eficientes, e neste contexto a cefamicina C foi descoberta, isolada de caldo fermentado por *Streptomyces* (BAGGALEY et al., 1997).

Apesar da similaridade estrutural (Figuras 2.1 e 2.2) e da presença dos mesmos passos metabólicos iniciais durante a biossíntese, a cefamicina C e a cefalosporina C são produzidas por diferentes micro-organismos. Enquanto a cefalosporina C é produzida pelo fungo *Cephalosporium acremonium*, a cefamicina C é produzida pelos actinomicetos *Streptomyces clavuligerus* e *Nocardia lactamdurans* (LIRAS, 1999). Trabalhos na literatura reportam a produção da cefamicina por meio de cultivos submersos aerados, em batelada ou batelada alimentada (BELLÃO et al., 2013), e também em cultivos em estado sólido (KOTA e SRIDHAR, 1999; KAGLIWAL, SURVASE e SINGHAL, 2009).

Figura 2.2 – Fórmula estrutural da Cefalosporina C



Fonte: Adaptado de Ramos, Otero e Rodrigues (2004).

As cefamicinas apresentam maior estabilidade às β -lactamases e maior atividade contra patógenos Gram-negativos e patógenos anaeróbios do que as cefalosporinas comuns, propriedades que são atribuídas à presença do grupo metoxil na molécula (DEMAIN e ELANDER, 1999). O modo de ação dos β -lactâmicos é similar: eles atuam inibindo a enzima trans-peptidase, responsável pela formação de ligações cruzadas durante a biossíntese da parede celular da bactéria. Sem ligações cruzadas, forma-se uma parede celular muito fraca, que é facilmente rompida (MURRAY E MOELLERING, 1981). A cefamicina não é usada diretamente como antibiótico no tratamento de doenças bacterianas, mas como matéria-prima para a produção de antibióticos semissintéticos, como a cefoxitina e cefotetan (DEMAIN e ELANDER, 1999). Por meio de modificações químicas nas cadeias laterais ligadas aos carbonos C7 ou C3 da molécula, os antibióticos semissintéticos foram desenvolvidos, gerando fármacos com maior espectro de ação e diferentes propriedades farmacocinéticas (MURRAY E MOELLERING, 1981).

2.2-Separação de produtos biotecnológicos

Vários compostos de interesse industrial, incluindo antibióticos, etanol, ácido cítrico, enzimas, hormônios e aminoácidos (HARRISON et al., 2003; KILIKIAN e PESSOA JR., 2005), são produzidos por meio de bioprocessos – processos nos quais a transformação da matéria-prima no produto de interesse é conduzida por um organismo vivo. Quando se trata de um processo microbiano, ao final da etapa de produção, obtém-se um caldo de cultivo de composição complexa e heterogênea, contendo além da biomolécula de interesse, uma elevada proporção de água, moléculas orgânicas e inorgânicas constituintes do meio de cultivo, metabólitos extracelulares, metabólitos intracelulares oriundos de células lisadas e fragmentos celulares. É deste caldo que o composto de interesse deve ser isolado, purificado e eventualmente derivatizado antes do seu uso comercial. Esta enorme variedade e quantidade de moléculas presentes no caldo torna o desenvolvimento dos processos de purificação tão desafiantes quanto o estudo das etapas de cultivo (KILIKIAN e PESSOA JR., 2005).

A etapa de bioseparação, também conhecida como “downstream process” ou processo a jusante, pode ser dividida em quatro estágios, descritos a seguir (BELTER et al., 1988; HARRISON et al., 2003; KILIKIAN e PESSOA JR., 2005).

Clarificação/Remoção de insolúveis: retirada de células, fragmentos celulares, componentes do meio de cultura e produtos não solúveis. Nesta etapa há uma redução na turbidez do meio e uma pequena concentração do produto pode ocorrer. A centrifugação e filtração são as principais operações unitárias utilizadas.

Isolamento do produto: remoção de material com características físico-químicas bem diferentes do produto desejado. A extração com solvente e adsorção são típicas, podendo também ser usados a ultrafiltração e precipitação. Geralmente, consegue-se uma considerável concentração do produto ou melhora na sua qualidade.

Purificação: as operações unitárias empregadas nesta etapa são altamente seletivas e removem as impurezas com propriedades químicas e físicas similares ao composto de interesse. A cromatografia, métodos de afinidade, cristalização e precipitação fracionada são bons exemplos.

Refinamento: remoção de líquidos e conversão do produto na sua forma cristalina, quando possível. O uso final do produto desejado geralmente dita a sequência final utilizada. Operações típicas são a cristalização e secagem.

Quando o produto desejado é um metabólito intracelular, a operação de rompimento celular deve ser acrescentada ao processo e é realizada no adensado de células obtido após a etapa de clarificação (KILIKIAN e PESSOA JR., 2005).

O Quadro 2.1 apresenta as operações unitárias empregadas nos processos de purificação executados em escala industrial, agrupando-as nas etapas da purificação em que participam e o princípio de separação envolvido.

Quadro 2.1 - Operações Unitárias utilizadas em processos de separação e purificação de produtos biotecnológicos, e princípios envolvidos na separação (KILIKIAN e PESSOA JR, 2005)

Etapas do processo	Operações Unitárias	Princípio
Clarificação	Filtração convencional	Tamanho de partículas
	Centrifugação	Tamanho e densidade de partículas
	Centrifugação tangencial (membranas)	Tamanho de partículas
	Floculação	Hidrofobicidade de partículas
Rompimento de células	Homogeneização	Cisalhamento
	Ultra-som	Cisalhamento
	Moagem em moinho de bolas	Cisalhamento
	Rompimento químico ou Enzimático	Hidrólise, solubilização ou desidratação de moléculas que compõem a parede ou a membrana celular
Purificação de baixa resolução	Precipitação	Solubilidade
	Ultrafiltração (membranas)	Massa molar e raio hidrodinâmico de moléculas
	Extração em sistema de duas fases líquidas	Solubilidade, massa molar
Purificação de alta resolução	Cromatografia de troca iônica	Tipo e densidade de carga na superfície da biomolécula
	Cromatografia de afinidade (biológica ou química)	Sítios específicos na superfície de uma proteína (adsorção)
	Cromatografia de imunoafinidade	Sítios específicos na superfície de uma proteína (adsorção antígeno/anticorpo)
	Cromatografia de interação hidrofóbica	Hidrofobicidade
	Cromatografia de exclusão molecular	Massa molar
Refinamento	Membranas adsortivas	Massa molar e características para adsorção ou sítios específicos da superfície de uma proteína
	Cristalização	Solubilidade e características de equilíbrio líquido-sólido
	Liofilização	Características de equilíbrio líquido-sólido
	Secagem	Características de equilíbrio líquido-sólido

Fonte: Kilikian e Pessoa Jr (2005)

Como na produção, não existe um processo de purificação universal. Para cada produto devem ser definidas suas próprias operações unitárias e condições de operação, baseando-se na exploração eficiente das diferenças de propriedades físico-químicas entre o produto de interesse e os contaminantes presentes (ASENJO e ANDREWS, 2008). Para propósitos de separação, propriedades importantes que devem ser conhecidas incluem estabilidade térmica, solubilidade, difusividade, carga, ponto isoelétrico, constantes de taxa de reação e termodinâmica de separação (HARRISON et al., 2003). A aplicação final do produto também influencia na definição das etapas do processo. Para alguns, como os produtos farmacêuticos, a legislação reguladora impõe a comercialização de medicamentos com elevado grau de pureza, exigindo-se, assim, a aplicação de técnicas de alta-resolução, como a cromatografia. Já outros produtos podem ser comercializados com um grau de pureza menor, como alguns ácidos orgânicos e enzimas industriais (KILIKIAN e PESSOA JR, 2005).

A viabilidade econômica também é um fator importante. Geralmente, a etapa de separação representa uma parcela considerável dos custos de processo, podendo chegar a mais de 50% do custo total (KEIM e LADISCH, 2000). Assim, a fim de diminuir o número de etapas empregadas na purificação, procura-se utilizar operações que combinem mais de uma finalidade, como concentração e pré-purificação (KILIKIAN e PESSOA JR, 2005). A pureza exigida também exerce uma grande influência no preço final, já que atingir um maior grau de pureza geralmente significa aplicar mais etapas de purificação. Mas como produtos com alto grau de pureza geralmente são produtos com alto valor agregado, os custos de processo são compensados pelo preço pago pelo mercado (KEIM e LADISCH, 2000).

As técnicas de separação baseadas nos processos adsorptivos são amplamente aplicadas no isolamento e purificação de produtos oriundos de bioprocessos, sejam eles lipofílicos ou hidrofílicos (DUTTA et al. 2004). Os processos de adsorção têm destaque em relação às outras técnicas de separação, já que propiciam um alto fator de concentração, o que satisfaz a necessidade de uma alta recuperação do produto de interesse (SAIKIA e DUTTA, 2006), são processos não-desnaturantes, altamente seletivos, eficientes energeticamente e de custo relativamente baixo (RAMOS et al., 2004).

2.3- Adsorção e troca iônica na purificação de produtos biotecnológicos

A utilização dos fenômenos de adsorção e troca iônica para fins práticos remonta a períodos muito antigos da nossa civilização. Egípcios e sumérios usavam o carvão ativado para reduzir os níveis de cobre, zinco e estanho durante a manufatura do bronze. Os

fenícios também utilizavam o carvão para tratamento de água e obtenção de água potável. Aristóteles descreveu em sua *Problemata* a diminuição da concentração de sal na água do mar quando esta percolava através da areia. Inicialmente, o emprego da técnica era puramente empírico e apenas em 1773 foram realizados estudos quantitativos do fenômeno de adsorção e então a primeira abordagem sistemática foi desenvolvida (KAMMERER, CARLE e KAMMERER, 2011). Nos anos seguintes, esta tecnologia se desenvolveu rapidamente e atualmente é aplicada em diferentes ramos industriais, como na indústria farmacêutica, alimentícia, petrolífera, tratamento de água, etc.

Os processos de adsorção podem ocorrer entre fases gasosa e sólida ou entre fases líquida e sólida. Neste trabalho, apenas os processos do segundo tipo serão abordados.

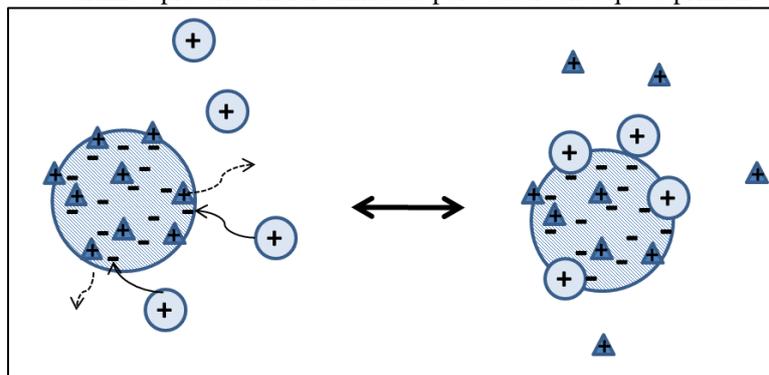
Os processos de adsorção envolvem a separação de uma substância presente em uma fase fluida acompanhada da sua acumulação ou concentração na superfície de outra fase sólida. A fase em que há a adsorção é chamada de adsorvente e o material concentrado ou adsorvido é chamado de adsorbato (WEBER, 1985). A separação ocorre devido à afinidade diferencial entre as várias moléculas presentes na matriz e o material que constitui a fase estacionária, o adsorvente. Diferentes tipos de interação são aproveitados para que ocorra a separação e isolamento dos compostos presentes na matriz, como por exemplo interações eletrostáticas, interações π , hidrofóbicas e de afinidade (HARRISON et al., 2003; SAIKIA, 2008).

O fenômeno de troca iônica acontece de forma semelhante à adsorção, mas existem algumas diferenças entre ambos. Na troca iônica, as moléculas de adsorbato são íons e o adsorvente possui grupos funcionais iônicos em sua superfície. Devido às interações eletrostáticas, moléculas de cargas contrárias à carga do sítio ativo do adsorvente são atraídas e acumulam-se na superfície do sólido, com subsequente deslocamento destas espécies por outros adsorbatos iônicos com maior afinidade eletrostática. Neste processo, o adsorbato desloca um contra-íon previamente ligado ao sítio ativo, de forma a atingir a eletroneutralidade. Há, então, dois fluxos iônicos: um em direção às partículas do adsorvente e outro na direção da fase fluida (Figura 2.3) (KAMMERER, CARLE e KAMMERER, 2011).

Alguns autores consideram a troca iônica um caso especial de adsorção e na literatura encontra-se muito o termo adsorção por troca iônica ou adsorção de íons (BAILEY E OLLIS (a), 1986; ALMEIDA, BARBOZA e HOKKA, 2003; KILIKIAN e PESSOA JR, 2005; DATTA et al.; 2011). Como as operações utilizadas empregando a adsorção ou a troca iônica são muito semelhantes, para propósitos de engenharia essa consideração é

frequentemente adotada e muitos modelos e teorias desenvolvidos para adsorção são aplicados também para a troca iônica (GEANKOPLIS, 2003; KAMMERER, CARLE e KAMMERER, 2011).

Figura 2.3- Representação esquemática da troca iônica na superfície de um adsorvente catiônico. A figura mostra a troca do adsorbato representado por um triângulo pelo adsorbato em forma de círculo, indicando que este último apresenta maior afinidade pelo adsorvente que o primeiro.



Fonte: Adaptado de Collins (1995)

Weber (1985) divide os processos de adsorção em quatro tipos principais: física, química, específica e a de troca iônica, definida acima. A adsorção física, ou fisissorção, é resultante da ação de interações intermoleculares relativamente fracas, como forças de van der Waals (dispersão-repulsão) e interações eletrostáticas clássicas, compreendendo a polarização e momentos dipolo. A adsorção química envolve a formação de uma ligação química entre o adsorbato e o adsorvente, resultando em uma mudança química do adsorbato. O Quadro 2.2 apresenta as principais diferenças entre a adsorção física e a química (GUBULIN, 1990).

Quadro 2.2 - Principais diferenças entre a adsorção física e química

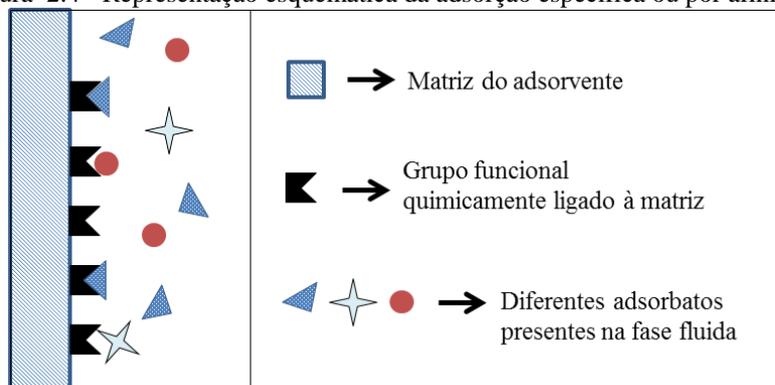
FISSORÇÃO	QUIMISSORÇÃO
Baixo calor de adsorção	Alto calor de adsorção
Não específica	Altamente específica
Mono ou multicamada	Somente monocamada
Sem dissorção das espécies envolvidas	Pode ocorrer dissorção
Significante apenas em baixas temperaturas	Possível sob grande faixa de temperatura
Rápida, não ativada	Ativada, pode ser lenta
Reversível	Irreversível
Sem transferência de elétrons, embora possa ocorrer polarização	Com transferência de elétrons e formação de ligação química com a superfície

Fonte: Ruthven (1984)

A quimissorção tem grande importância no estudo da catálise heterogênea, enquanto que a fisissorção é mais utilizada para separação de compostos presentes em mistura (GUBULIN, 1990).

A adsorção específica, também chamada de adsorção por afinidade, resulta na ligação de moléculas de adsorbato a grupos funcionais presentes na superfície do adsorvente e que não geram uma transformação química do adsorbato. Geralmente, estes grupos funcionais apresentam especificidade biológica que os tornam muito seletivos para determinado tipo de adsorbato (Figura 2.4). Como exemplos podem ter citados antígenos, enzimas ou lecitinas, que retiram da fase fluida anticorpos, proteínas ou açúcares, respectivamente (COLLINS, 1995).

Figura 2.4 - Representação esquemática da adsorção específica ou por afinidade.



Fonte: Adaptado de Collins (1995)

2.3.1-Equilíbrios de adsorção

Em um sistema específico, a adsorção de uma substância presente em uma fase fluida na superfície de outra fase sólida leva a uma distribuição termodinamicamente definida desta substância entre as fases, quando o sistema atinge o equilíbrio. Uma maneira comum de representar esta distribuição é expressar a quantidade de substância adsorvida por unidade de massa de adsorvente, q , em função da concentração da substância em solução no equilíbrio, a uma temperatura constante. Este tipo de expressão é denominada isoterma de adsorção (WEBER, 1985).

Isotermas experimentais são necessárias para descrever a capacidade de adsorção de determinado sistema, facilitando a avaliação da aplicação do processo, para seleção do adsorvente mais apropriado e para determinação preliminar da quantidade necessária de adsorvente. A partir dos dados de isotermas também é possível realizar a

interpretação teórica dos parâmetros termodinâmicos, como as entalpias de adsorção (WEBER, 1985).

Existem vários modelos de equilíbrio desenvolvidos para descrever as isotermas de adsorção. Alguns modelos foram deduzidos a partir da aplicação de conceitos teóricos, enquanto outros foram deduzidos empiricamente (DUTTA, BORAH e DUTTA, 2004; KAMMERER, CARLE e KAMMERER, 2011). No Quadro 2.3 são apresentados os modelos de isotermas mais comumente aplicados no estudo de adsorção de alguns antibióticos. Na sequência, são apresentadas as definições destes modelos.

Quadro 2.3 - Modelos de isotermas de equilíbrio de adsorção aplicados no estudo da adsorção ou troca iônica de alguns antibióticos

Antibiótico	Adsorvente	Modelo de isoterma	Referência
Ácido clavulânico	IRA400; Zeólita	Langmuir	BARBOZA, ALMEIDA E HOKKA (2003); FORTE, RODRIGUES E MAUGERI (2011)
Ácido 7-aminocefalosporânico	XAD4 e XAD16	Langmuir e Freundlich	DUTTA, DUTTA E BHATTACHARYA (1999)
Cefalexina	XAD4, XAD16 e XAD2	Langmuir e Freundlich	DUTTA, DUTTA E BHATTACHARYA (1999)
Cefalosporina C	XAD2, SP207 e SP850	Freundlich	LEE, PARK E MOON (1997)
	XAD4, XAD1180, HP20	BET	HICKETIER E BUCHHOLZ (1990)
	XAD16, XAD4	Langmuir	RAMOS, OTERO E RODRIGUES (2004); SAIKIA (2008)
Cefamicina C	Q-Sepahrose XL	Langmuir	RODRIGUEZ (2011)
Eritromicina	XAD4, IRA410	Langmuir e Freundlich	RIBEIRO E RIBEIRO (2003)
Penicilina G	XAD4	Langmuir	BARROS (2008)
Vancomicina	XAD16	Langmuir	BORIN E PAVKO (2009)

- Modelo de Langmuir

O modelo de Langmuir foi um dos primeiros modelos propostos baseados em uma teoria coerente de adsorção, utilizando uma abordagem cinética. Segundo ele, na adsorção há um contínuo bombardeamento de moléculas sobre a superfície do adsorvente e uma correspondente dessorção das moléculas desta superfície de forma que, no equilíbrio, a taxa de acumulação é nula (DO, 1998). O modelo é representado pela equação 2.1 abaixo:

$$q^* = \frac{q_m C^*}{K_D + C^*} \quad (2.1)$$

em que q^* é a quantidade de soluto adsorvido por unidade de massa do adsorvente, no equilíbrio; q_m é a concentração na fase sólida correspondente à completa cobertura dos sítios disponíveis, ou a capacidade limitante de adsorção; e C^* é a concentração do adsorbato na fase líquida no equilíbrio e K_D é a constante de equilíbrio e está relacionada ao calor de adsorção.

Este modelo assume que a energia de adsorção é constante e independente da cobertura da superfície; a adsorção ocorre em sítios definidos e localizados; não há interação entre as moléculas do adsorbato; e o máximo de adsorção ocorre quando a superfície é coberta por uma monocamada de adsorbato (WEBER, 1985).

- Modelo BET

Brunauer, Emmett, e Teller estenderam o modelo de Langmuir para incluir o fenômeno de adsorção em multicamada. As principais hipóteses assumidas neste modelo são: os sítios de adsorção são energeticamente homogêneos, não há interação entre moléculas de uma mesma camada, não há necessidade de que uma camada esteja completa para que outras comecem a se formar; a primeira camada de moléculas se adere à superfície com uma energia comparável ao calor de adsorção para a formação da monocamada (WEBER, 1985). Assumindo que as camadas acima da primeira possuem a mesma energia de adsorção, o modelo é representado pela equação 2.2:

$$\frac{q^*}{C_M} = \frac{a C^* [1 - (n' + 1) b^{n'} C^{*n'} + n' b^{n'+1} C^{*n'+1}]}{(1 + b C^*) [1 + (a - b) C^* - a b^{n'} C^{*n'+1}]} \quad (2.2)$$

em que C_M é a quantidade adsorvida em relação à massa total de adsorvente para cobertura completa da monocamada; n' é o número de camadas incluindo a monocamada; a é o

coeficiente de equilíbrio para a monocamada (relação entre a adsorção e dessorção); b é o coeficiente de equilíbrio para todas as outras camadas (HICKETIER e BUCHHOLZ, 1990).

- Modelo de Freundlich

Apesar do embasamento teórico dos modelos de Langmuir e BET, o equilíbrio de adsorção de alguns sistemas nem sempre se ajusta bem a estes modelos. Descobriu-se que os dados de equilíbrio de adsorção geralmente são melhor representados pela relação dada pela equação 2.3, que corresponde ao modelo de isoterma de Freundlich.

$$q^* = K_F C^{1/n} \quad (2.3)$$

em que K_F e $1/n$ são constantes características. Tentou-se atribuir significância física a estes parâmetros, mas, na maioria das vezes não foi obtido sucesso. Entretanto, os valores de K_F podem ser tomados como um indicador relativo da capacidade de adsorção, e $1/n$ como um indicativo da energia ou intensidade da adsorção (WEBER, 1985).

- Modelo Linear

É o modelo de isoterma mais simples, descrito pela equação 2.4:

$$q^* = k C^* \quad (2.4)$$

em que k é a constante do modelo.

Este modelo tem como vantagem a descrição de um conjunto de dados de adsorção em função de apenas um parâmetro, k . Apesar da simplicidade, o modelo linear de partição não é apenas uma conveniência matemática para facilitar o tratamento dos dados, ele também tem embasamento teórico. Pode-se notar que todos os modelos discutidos anteriormente, sob certas condições, são simplificados em relações lineares. Por exemplo, no modelo de Langmuir, para soluções muito diluídas, chega-se a uma relação linear. Entretanto, o modelo é raramente válido para grandes variações de concentração e por isso não pode ser extrapolado além dos limites do conjunto de dados a que foi ajustado.

2.3.2 - Cinética de adsorção e transferência de massa

Na descrição da cinética intrínseca, a adsorção é considerada uma “pseudo-reação” na qual o adsorbato (S) “reage” (interage) com o sítio ativo do adsorvente (R), levando à formação do complexo adsorbato-sítio ativo (q) (equação 2.5).



Na literatura, modelos cinéticos de primeira ordem, pseudo-primeira ordem, pseudo-segunda ordem e também modelos mistos já foram utilizados para descrever a cinética de adsorção em diferentes sistemas (KAMMERER, CARLE e KAMMERER, 2011).

Barboza, Hokka e Maugeri (2002) consideraram a adsorção um processo reversível em que mais de uma molécula de cefalosporina C seria adsorvida pelo sítio ativo da resina XAD2, o que levou à equação cinética descrita pela equação 2.6. Almeida, Barboza e Hokka (2003) e Rodriguez, Hokka e Barboza (2010) utilizaram modelo semelhante para descrever a cinética de adsorção de antibióticos em resinas poliméricas aniônicas, exceto que utilizaram $n=1$, ou seja, apenas uma molécula se liga a um sítio ativo.

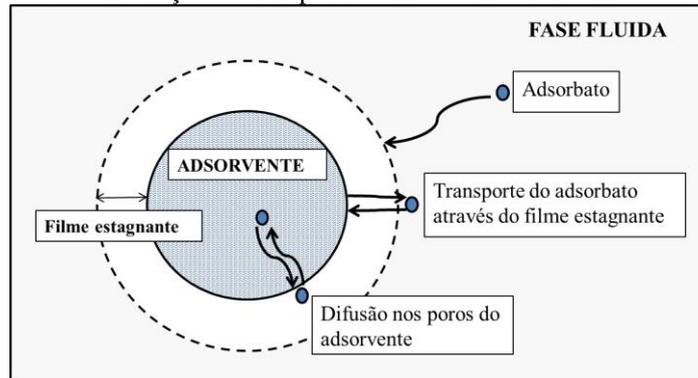
$$\frac{dq}{dt} = k_{ad} C_S^n (q_m - q) - k_{des} q \quad (2.6)$$

sendo q e C_S as concentrações do adsorbato na fase sólida e em solução, respectivamente, n é o número de moléculas de adsorbato que se ligam a cada sítio ativo do adsorvente, k_{ad} e k_{des} as constantes cinéticas intrínsecas de adsorção e dessorção, e q_m a capacidade máxima de adsorção da resina.

Em um processo adsorptivo, a velocidade com que o adsorbato é transferido da fase fluida para a fase sólida não depende apenas da cinética intrínseca de adsorção, mas também dos mecanismos de transferência de massa que levarão o adsorbato até a superfície do adsorvente. A Figura 2.5 apresenta um diagrama esquemático das três principais etapas consecutivas envolvidas no transporte de massa (GUBULIN, 1990).

Para que a adsorção ocorra, as seguintes etapas devem ser alcançadas (GUBULIN, 1990; WEBER, 1985):

Figura 2.5 - Ilustração do transporte de massa em um sistema de adsorção



Fonte: Adaptado de Bailey e Ollis (b) (1986).

1) Transporte do adsorbato presente na fase fluida até à superfície do filme estagnante que envolve a partícula de adsorvente. Esta etapa geralmente é rápida devido à agitação e/ou transporte convectivo do fluido.

2) Transferência de massa externa: transporte através do filme estagnante até a superfície externa do adsorvente. Este transporte é governado pela difusão molecular ou, em caso de fluxo turbulento, pelos turbilhões de massa e difusão, que controlam a espessura efetiva do filme.

3) Transferência de massa interna: caso o adsorvente seja poroso, há também o processo de difusão do adsorbato através dos poros.

4) Adsorção (ou troca iônica) propriamente dita: contato físico entre o adsorbato e os sítios ativos do adsorvente devido às interações químicas existentes entre ambos. Esta etapa geralmente é considerada muito rápida, equivalente a uma reação em equilíbrio.

Estes mecanismos vão dar corpo às equações constitutivas associadas ao balanço de massa do sistema de adsorção, possibilitando a descrição matemática do processo (GUBULIN, 1990).

2.3.3- Sistemas de operação

Em biotecnologia, os mais importantes sistemas de operação utilizando processos adsorptivos são colunas em leito fixo ou reatores de mistura, operados de forma contínua ou em batelada (WEBER, 1985; HARRISON et al, 2003).

2.3.3.1 – Adsorção em colunas de leito fixo

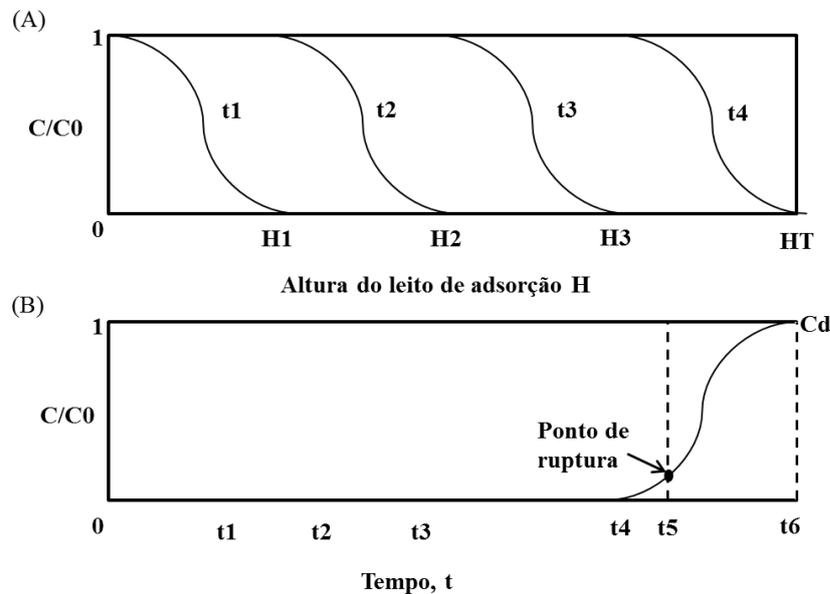
No processo de adsorção em coluna de leito fixo podem ser distinguidos três ciclos diferentes: alimentação da coluna, lavagem do leito e eluição.

O primeiro ciclo é a alimentação, no qual o fluido a ser tratado é bombeado para a entrada da coluna, geralmente a uma vazão fixa. No início da alimentação, a concentração de soluto no leito é zero. Quando o fluido alimentado entra em contato com o adsorvente, os processos de transferência de massa e adsorção se iniciam e a concentração do soluto na fase líquida vai diminuindo conforme o fluido vai passando pelo leito. A região no leito onde a maior parte da adsorção ocorre é chamada de zona de transferência de massa. Nos tempos iniciais da alimentação, a concentração de soluto na saída da coluna é zero, já que todo o soluto é adsorvido no leito. À medida que o tempo vai passando, o adsorvente vai sendo saturado e com menos sítios disponíveis para adsorção, nem todo soluto é retido. Assim, começa a ser detectado soluto na saída da coluna, que corresponde ao momento no qual a zona de transferência de massa atinge o final da coluna. A concentração de soluto na saída começa a aumentar lentamente até um momento em que aumenta abruptamente. Este ponto é chamado de ponto de ruptura e neste momento a alimentação deve ser desligada (Figura 2.6 (B)). Normalmente, o ponto de ruptura é tomado como o tempo no qual C/C_0 está entre 0.01 e 0.05, sendo que C_0 é a concentração do adsorbato na alimentação e C a concentração na saída da coluna (GEANKOPLIS, 2003). A Figura 2.6 (A) apresenta os perfis de concentração do adsorbato na fase fluida, que variam com o tempo e ao longo do leito da coluna.

Na etapa de alimentação da coluna, dados importantes do processo podem ser obtidos por meio da construção das curvas de ruptura (Figura 2.6 (B)). A obtenção de curvas de ruptura é um passo importante no desenvolvimento de processos em coluna, pois, a partir delas, pode-se calcular a eficiência do leito em diferentes condições de operação e realizar os cálculos de aumento de escala. Ela é obtida plotando-se a concentração na saída da coluna em relação à concentração na alimentação (C/C_0) em função do tempo, até que a concentração na saída se iguale à concentração na entrada ($C/C_0 \sim 1$). A forma de uma curva de ruptura usualmente depende da isoterma de adsorção, da vazão, da velocidade de transferência de massa externa das partículas e difusão nos poros. Para zonas de transferência de massa estreitas, a ruptura é abrupta e a curva assume um formato bem íngreme. Nestes casos, a maior parte da capacidade do leito é utilizada até o ponto de ruptura, o que leva a um uso eficiente do adsorvente (GEANKOPLIS, 2003). Os cálculos para determinação da capacidade

do leito, ponto de ruptura e eficiências serão detalhados posteriormente, no capítulo de materiais e métodos.

Figura 2.6 – Perfis de concentração do soluto na fase fluida em colunas de leito fixo. (A) Variação da concentração com o tempo e ao longo da posição no leito; (B) Representação de uma curva de ruptura, sendo C a concentração na saída da coluna



Fonte: Adaptado de Geankoplis (2003).

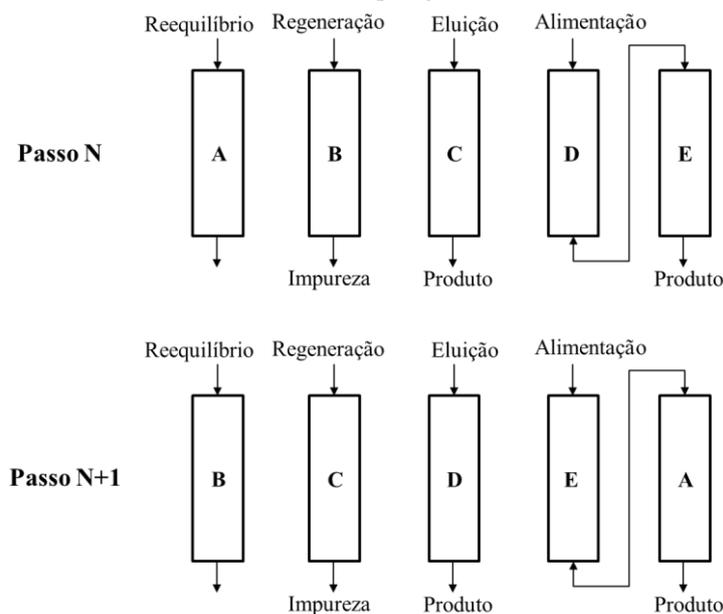
O segundo ciclo do processo em coluna é a lavagem do adsorvente, em que água (ou outra solução apropriada) é passada na coluna para retirada de material não adsorvido, retido nos espaços vazios do leito. O terceiro e último ciclo é a eluição. Neste ciclo, uma solução apropriada, chamada de eluente, é bombeada para a entrada da coluna e provoca a dessorção dos compostos retidos nos sítios ativos do adsorvente. A dessorção ocorre devido à maior afinidade do eluente pelos sítios ativos do adsorvente ou pela mudança de condições do sistema (ex: pH, temperatura) que reduzam a afinidade do adsorbato. A determinação adequada do eluente é um passo fundamental no processo de purificação em coluna, pois dependendo da natureza e concentração desta solução, ela promoverá a dessorção diferencial dos compostos adsorvidos, possibilitando a separação dos mesmos.

Algumas vezes são necessárias etapas adicionais de limpeza e regeneração do adsorvente. A limpeza promove a retirada de compostos fortemente adsorvidos que não foram dessorvidos durante a eluição. A regeneração restaura os sítios de adsorção para a forma apropriada que favoreça um novo processo de adsorção. Assim, um novo ciclo pode ser iniciado.

O processo de adsorção em leito fixo também pode ser conduzido de forma contínua, como nos sistemas de leito móvel simulado ou processo em carrossel. Nestes

processos, há um conjunto de colunas colocadas em série onde a alimentação, o eluente ou o regenerante são aplicados em sequências definidas e diferentes para cada coluna. A válvula de alimentação se move periodicamente no mesmo sentido do fluxo, simulando um movimento periódico da coluna em contracorrente ao fluxo de fluido. A Figura 2.7 apresenta um esquema de funcionamento de um processo em carrossel, formado por cinco colunas e quatro ciclos de operação (MUN et al., 2006).

Figura 2.7 – Diagrama esquemático de um processo de adsorção contínuo em carrossel com quatro zonas de operação



Fonte: MUN et al. (2006)

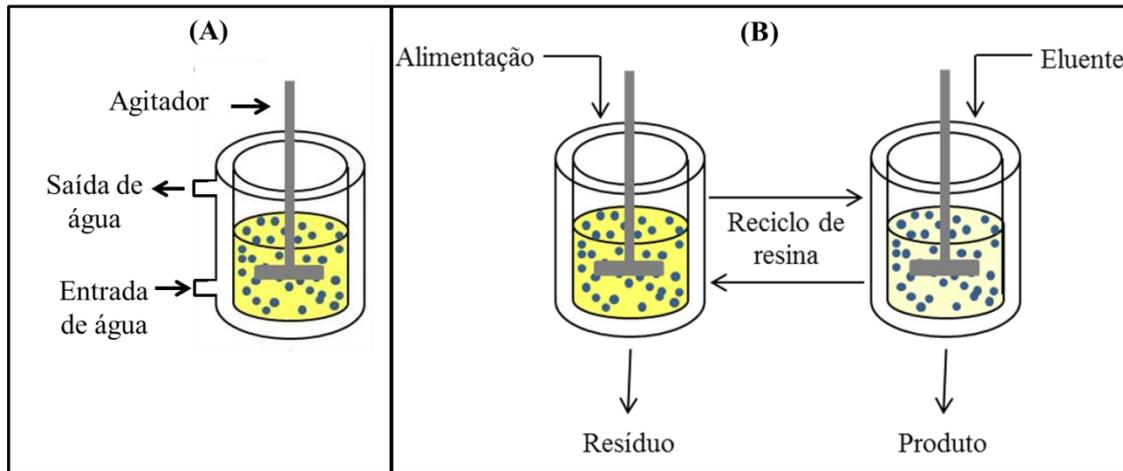
No passo N, as colunas D e E estão no ciclo de alimentação, sendo que a E é chamada de coluna guarda. Quando a zona de transferência de massa do soluto a ser purificado atinge o final da coluna D, o passo N+1 se inicia. A válvula de alimentação se move para a coluna E. A coluna A, que no passo N estava no ciclo de reequilíbrio, passa a ser a nova coluna guarda. A coluna D passa para o ciclo de eluição. A coluna C passa para o ciclo de limpeza ou regeneração, e a B para o ciclo de reequilíbrio. O sistema é operado continuamente desta maneira cíclica (MUN et al., 2006).

O processo em batelada utilizando uma única coluna é mais aplicado para pequenas escalas de produção, já que é mais fácil de delinear, de compreender e exige apenas equipamentos convencionais de cromatografia (MUN et al., 2006). O processo contínuo é mais complexo para ser delineado e aplicado, mas apresenta grandes vantagens em relação à batelada, como alta produtividade, alto fator de purificação e baixo consumo de solvente (CRAMER e HOLSTEIN, 2011).

2.3.3.2 – Adsorção em reatores de mistura

O processo operado em reator de mistura é apresentado pela Figura 2.8 (A).

Figura 2.8 - (A) Reator de mistura encamisado; (B) Sistema contínuo de adsorção formado por dois reatores de mistura



Fonte: Adaptado de Almeida, Barboza e Hokka (2003).

Neste modo de operação, o reator é carregado com o adsorvente e a fase fluida contendo o adsorbato e o processo é iniciado ligando-se a agitação, promovida por um impelidor. Com o passar do tempo, a concentração do adsorbato na fase fluida vai diminuindo, devido a sua acumulação na fase sólida, até que o equilíbrio seja atingido. Após a etapa de adsorção, a fase líquida é retirada do reator e seguem-se as operações de lavagem e eluição, em que o reator é novamente carregado com soluções adequadas a cada etapa. Ao final da eluição, obtém-se uma solução com um maior grau de pureza e/ou mais concentrada em relação ao adsorbato. O processo em reator de mistura também pode ser operado de forma contínua. Sistemas formados por dois reatores interligados através de reciclo do adsorvente já foram propostos na literatura (BARBOZA, HOKKA e MAUGERI, 2002; ALMEIDA, BARBOZA e HOKKA, 2003; RODRIGUEZ, 2011) (Figura 2.8 (B)). No primeiro reator ocorre a etapa de adsorção. Há contínua alimentação do material a ser purificado e retirada de resíduo. O segundo reator é alimentado com a solução eluente, causando a dessorção e concomitante regeneração da resina, e ocorre também a retirada da fase líquida, contendo o adsorbato que foi dessorvido. Esta configuração permite o uso mais eficiente da capacidade do adsorvente, já que maximiza a transferência de massa dentro do sistema. Este tipo de processo é recomendado para separações mais difíceis, nas quais a seletividade é baixa e/ou a transferência de massa é lenta (GUBULIN, 1990).

2.3.4 - Tipos de adsorventes

Muitos materiais adsorventes têm sido desenvolvidos para diferentes tipos de aplicação. Tipicamente, apresentam a forma de pequenas esferas, pellets ou grânulos, com tamanhos variando entre 0,1 mm a 12 mm. Muitos adsorventes são formados por estruturas muito porosas, sendo que o volume dos poros pode representar até 50% do volume total da partícula (GEANKOPLIS, 2003). A porosidade é uma propriedade importante destes materiais, já que seu aumento leva concomitantemente ao aumento da área superficial (KUNIN, 1976). E sendo a adsorção um fenômeno de superfície, a área superficial está diretamente relacionada à capacidade de adsorção. O tamanho dos poros também influencia na capacidade do adsorvente. O poro deve ter um tamanho adequado que permita a difusão do adsorbato pelo seu interior até o contato com a superfície (KAMMERER, CARLE e KAMMERER, 2011). Os adsorventes não-porosos geralmente são sólidos finamente divididos ($< 10 \mu\text{m}$) e apresentam grande área superficial devido justamente ao pequeno tamanho de partícula alcançado, empregando técnicas como trituração, precipitação, etc (KUNIN, 1976). Além da área superficial, porosidade e distribuição do tamanho de poros, outras propriedades importantes dos materiais adsorventes são distribuição do tamanho de partícula, polaridade, grupos funcionais e resistências química e mecânica (KAMMERER, CARLE e KAMMERER, 2011).

A utilização de materiais adsorventes pelas indústrias farmacêutica e alimentícia é regulada por legislação específica de cada país, assim como pelo órgão americano FDA (“Food and Drug Administration”) e pelo Conselho Europeu (“Council of Europe”). Uma breve descrição dos materiais adsorventes mais importantes e empregados é feita a seguir.

Carvão ativado: obtido pela decomposição térmica de material carbonáceo de origem vegetal ou animal (ex: madeira, casca de vegetais, carvão mineral, etc.). O controle de alguns parâmetros de processo permite a obtenção de materiais com diferentes características – em forma de grânulos, pó ou pellets, com áreas superficiais de 300 a 3000 m^2/g e volume de poro de 0,7 a 1,8 cm^3/g . O carvão ativado é um dos adsorventes porosos mais utilizados devido a eficiente capacidade de adsorção de diferentes tipos de adsorbatos. O amplo espectro de adsorção e a diversidade de formas em que pode ser encontrado permitiu uma ampla variedade de aplicações: remoção de substâncias indesejáveis de gás, líquido e vapor, tratamento de água, remoção de substâncias que afetam o sabor e o odor (WEBER, 1985; GEANKOPLIS, 2003; KAMMERER, CARLE e KAMMERER, 2011).

Zeólitas: são estruturas cristalinas de aluminosilicatos de metais alcalinos ou alcalinos terrosos, como sódio, potássio ou cálcio. Podem ser divididas em 40 tipos naturais ou mais de 150 sintéticos. A estrutura tridimensional das zeólitas formam aberturas internas, interligadas por canais que cruzam a estrutura. Os poros deste material são precisamente uniformes, o que os diferenciam de outros adsorventes que apresentam tamanhos de poros variados. Os tipos de zeólitas mais utilizadas são a A, X e Y. Também são utilizadas como peneiras moleculares (GEANKOPLIS, 2003; KAMMERER, CARLE e KAMMERER, 2011).

Sílica gel: é formada pelo tratamento ácido de solução de silicato de sódio e posterior secagem. A área superficial varia de 600 a 800 m²/g e o diâmetro de poro entre 20 e 50 Å. Atualmente, utiliza-se muito a sílica modificada, em que são adicionados grupos funcionais para ampliar as propriedades tecnológicas. É um adsorvente bastante hidrofílico e a adição de grupos cria novos materiais mais ou menos hidrofóbicos (GEANKOPLIS, 2003; KAMMERER, CARLE e KAMMERER, 2011).

Resinas sintéticas: são resinas poliméricas normalmente com uma grande área superficial interna. Podem ser obtidos na forma de gel, macroreticulado ou altamente reticulado. As resinas macroreticulares são caracterizadas pela alta porosidade. A presença de poros grandes leva a uma área superficial interna maior e aparência mais homogênea que as resinas tipo gel. Para aumentar a resistência mecânica, é necessário adicionar mais componentes de ligação cruzada na cadeia polimérica em comparação ao adicionado para as resinas tipo gel. Esta adição também adiciona outras propriedades interessantes, como maior volume interno, menor diferença na dilatação entre solventes polares ou apolares, menor diminuição do volume durante secagem da resina e maior estabilidade à oxidação. Devido ao maior tamanho dos poros, estas resinas permitem a recuperação de moléculas maiores, que conseguem ter acesso aos poros. As resinas altamente reticuladas são extremamente rígidas, com grau de ligação cruzada acima de 40%. Possuem capacidades de adsorção muito maiores que os outros adsorventes conhecidos, devido ao volume interno muito grande.

Os trocadores iônicos sintéticos são formados por uma matriz apolar à qual grupos funcionais ionizáveis são ligados por ligações covalentes. A diversidade estrutural deste tipo de material é bem maior que das resinas neutras, devido aos diferentes grupos funcionais que podem ser ligados. A carga do grupo funcional da resina determina o tipo de trocador – aniônico (grupo funcional positivo); catiônico (grupo negativo) ou anfótero (grupos positivos e negativos) (KAMMERER, CARLE e KAMMERER, 2011).

2.4 - Processos de purificação da cefamicina C

Como já mencionado, existem poucos trabalhos na literatura sobre processos de separação e purificação da cefamicina C e a maior parte deles estão na forma de patentes.

O primeiro trabalho relacionado ao processo de purificação da cefamicina C foi publicado por Miller et al. (1972), concomitantemente à publicação do artigo descrevendo a descoberta das cefamicinas A, B e C (STAPLEY et al., 1972). Como primeiro passo de purificação, os autores realizaram uma filtração para separação do micélio celular. Em seguida, o caldo resultante foi aplicado em uma coluna de troca iônica empacotada com a resina Dowex 1 X 2, no ciclo cloreto, e a eluição foi feita com solução NaCl 5%. As frações com maior parte da atividade antimicrobiana foram combinadas, tiveram o pH ajustado para 2 e foram aplicadas em uma coluna de troca catiônica, utilizando a resina Dowex 50 X 2 no ciclo hidrogênio. A eluição foi feita com solução aquosa de piridina 2%. Desta coluna, frações com atividade foram combinadas, neutralizadas com solução de NaOH e concentradas sob pressão reduzida. O concentrado passou por uma cromatografia de troca iônica, utilizando novamente a resina Dowex 1 X 2, no ciclo cloreto. Como fase móvel foi utilizado o tampão piridina/HCl (0,1 M, pH 5). As frações com maior atividade foram agrupadas, tiveram o pH ajustado para 8 e foram concentradas até secarem. Como último passo de purificação, utilizou-se uma cromatografia em gel com a resina Bio-Gel P-2. O concentrado foi diluído em água, o pH ajustado para 7 e a fase móvel utilizada foi água. O produto final apresentou 40% de pureza.

Pines e Seemon (1976) reivindicaram em sua patente o seguinte processo de purificação: filtração do caldo em pH ácido; adsorção em carvão ativado seguida da dessorção pela passagem de uma mistura de água e solvente polar orgânico (acetona, butanol ou acetato de etila); passagem do efluente da dessorção contendo a cefamicina C em coluna empacotada com resina de troca iônica; eluição da coluna com solução salina (NaCl, Na₃PO₄, Na₂HPO₄, NaHCO₃) com pH variando de 5,5 a 10. Segundo o autor, é melhor a utilização de resinas de troca iônica fracamente básicas, como a IRA 45, IRA 47, IRA 68 e IRA 93, produzidas pela companhia Rohm and Haas. Com este processo, a cefamicina C no efluente final foi enriquecida de 20 a 70 vezes em relação às impurezas presentes no caldo bruto inicial, sendo que 45-65% do material orgânico no efluente era cefamicina C.

Na patente depositada por Wildman e Datta (1977), os autores realizaram o isolamento da cefamicina C utilizando um sistema de separação líquido-líquido, por meio de troca aniônica. Os líquidos iônicos utilizados foram compostos fortemente aniônicos como

compostos de amônio quaternário, utilizados em mistura com solventes orgânicos ou mistura de solventes com uma constante dielétrica moderadamente alta, em proporções variando de 5-30% (v/v) de líquido iônico/solvente. O processo de separação foi conduzido misturando-se a solução ou o caldo contendo a cefamicina C, com o pH ajustado para uma faixa entre 8,0-11,5, com o sistema de troca aniônica. Após separação das fases, a fase orgânica foi recolhida e misturada com outra solução aquosa, para re-extração da cefamicina C. Como exemplo, foi citado a utilização de tricaprilil-metil-amônio, no ciclo acetato, em n-butanol (30% v/v), como solução aniônica de troca. Volumes iguais desta solução e do caldo de cultivo, com pH ajustado para 11,5, foram misturados, e após centrifugação, as duas fases foram separadas. A re-extração foi feita misturando-se a fase orgânica com uma solução aquosa de ácido fosfórico, 4,25% (v/v). Desta forma, conseguiu-se uma extração de 98% na primeira etapa e 95% na segunda.

Em sua patente, Schubert (1980) reivindicou as seguintes etapas de purificação: filtração do caldo em pH ácido (pH entre 1,5 e 4,5); aplicação do filtrado em coluna empacotada com resina catiônica (Ex: Duolite C3); lavagem da coluna com água ou solução aquosa contendo uma pequena quantidade de cefamicina C; eluição com solução aquosa de NaCl, com concentração entre 5 e 15%. Após esta etapa, os efluentes da coluna das duas etapas anteriores foram combinados, o pH foi ajustado para 7,0-8,0 e a solução resultante foi recirculada na coluna. O processo de recirculação foi mantido até que o pH da corrente de saída alcançasse o valor entre 5,0-6,5. A fração final obtida continha cerca de 90% da cefamicina inicial.

Na patente depositada por Kawamura, Shoji e Matsumoto (1981), os autores desenvolveram um processo bem longo para obtenção da cefamicina C na forma de um sal. As etapas iniciais foram as mesmas propostas por Pines e Seemon (1976), exceto que a resina de troca iônica utilizada foi a BioRex-5. Após a etapa de troca iônica, as frações coletadas que apresentaram atividade antimicrobiana passaram novamente por adsorção em carvão ativado e eluídas com solução de acetona 50%. As frações ativas foram concentradas sob pressão reduzida até a obtenção de um xarope oleoso. Adicionou-se acetona a esse xarope, e após filtração, o precipitado retido foi seco. O pó obtido foi dissolvido em água e a solução aquosa resultante foi aplicada em uma coluna Sephadex G-10. Foi feita a eluição com água e as frações com atividade antimicrobiana foram aplicadas em uma coluna de leito fixo empacotada com a resina HP-20. O leito foi lavado com água a pH 2,0 e eluído com água a pH 7,0. As frações com atividade foram liofilizadas e passaram por cromatografia de camada delgada em sílica gel, reveladas com clorofórmio:etanol:água (4:7:2). As zonas ativas foram

eluídas com solução aquosa de metanol 50% e as frações obtidas concentradas sob pressão reduzida. As soluções concentradas foram ajustadas para pH 3,0 e adsorvidas em coluna com resina HP 20, previamente equilibrada com solução de NaCl, pH 3,0. A eluição da coluna foi feita com água. As frações com atividade tiveram o pH ajustado para 7,0 e foram liofilizadas. Já neste ponto, obteve-se um sal de sódio de cefamicina C quase puro. Os autores ainda propuseram outra cromatografia para refinamento da purificação. O sal de sódio foi dissolvido em água e passou por um leito com a resina Biogel P-2. A eluição foi feita com uma solução aquosa de butanol 1%. As frações com atividade foram liofilizadas, resultando em um sal de sódio de cefamicina C incolor.

Em outra patente, Kamogashira et al. (1982) reivindicaram dois processos diferentes para purificação da cefamicina C. Em um deles, adotou-se a seguinte sequência: centrifugação do caldo de cultivo; adsorção do sobrenadante, com pH ajustado para 7,0-8,0, na resina catiônica Diaion PA 406; eluição com solução de cloreto de sódio 0,5M; concentração da fração ativa sob baixa pressão, a 30°C; aplicação do concentrado em coluna empacotada com sílica gel ODS e nova concentração da fração obtida; realização de cromatografia de fase reversa em coluna de sílica gel ODS utilizando como fase móvel uma solução 0,01M de ácido acético; liofilização das frações ativas para obtenção da cefamicina na forma de um pó branco. No segundo método proposto, os passos de purificação foram os seguintes: filtração do caldo e adsorção do filtrado em resina Diaion PA 406, no ciclo cloreto, lavagem da coluna com água deionizada, seguida da eluição com solução de NaCl 1M; ajuste do pH da fração ativa coletada para 1 e adição de NaCl para uma concentração final de 4M; adsorção da solução resultante em resina Diaion HP 20 e eluição com água; coleta do eluente de saída da coluna quando este atingir um valor de pH próximo a 4; liofilização do eluente coletado para obtenção da cefamicina na forma de um pó branco.

Como acontece em todas as patentes, os autores apenas propõem os métodos de separação. Não há uma abordagem científica nem embasamento teórico sobre o comportamento da cefamicina C nos diferentes sistemas de separação. Na maioria das patentes citadas na revisão, os autores sugerem a utilização de resinas de troca iônica e resinas neutras para a purificação. Mas como não há dados experimentais, não se sabe qual das resinas é mais eficiente, nem as melhores condições operacionais para a purificação. Como não existem outros trabalhos publicados sobre o assunto, faz-se extremamente necessário o estudo comparativo das diferentes resinas existentes para processos de purificação, bem como a avaliação de diferentes condições operacionais na eficiência do processo, como temperatura de trabalho, pH de adsorção e eluição, natureza dos eluentes.

Alguns trabalhos sobre a purificação da cefamicina C a partir do caldo de cultivo já foram conduzidos pelo grupo de pesquisa em Engenharia Bioquímica do DEQ-UFSCar. Estudos preliminares mostraram que a cefamicina C pode ser extraída do caldo utilizando resinas poliméricas neutras, como as resinas XAD2, XAD1180, XAD4 e Diaion HP 20. O pH do meio influenciou muito na adsorção. Para a resina XAD4, por exemplo, em pH 2,8 prevaleceu a adsorção da cefamicina C em relação aos contaminantes monitorados. Já em pH 6,8, ocorreu o inverso – a adsorção dos contaminantes prevaleceu sobre a adsorção do antibiótico (MARTINS, 2010).

Baseando-se neste comportamento, Bustamante et al. (2008) propuseram um processo para retirada de contaminantes do caldo ultrafiltrado. Foi proposto um processo de adsorção em resina Amberlite XAD4 em reator de mistura, operado em batelada, e pH do meio igual ao pH do caldo (pH entre 6,6-6,8). Esta etapa possibilitou a retirada de pigmentos, promovendo uma clarificação do caldo. Neste mesmo trabalho, foi proposto uma etapa de troca iônica operada em coluna de leito fixo, com a resina aniônica Q Sepharose XL, realizada após a clarificação do caldo com a resina XAD4. A eluição da coluna no modo gradiente degrau com soluções de NaCl 0,1%, NaCl 0,3% e NaCl 0,5% (m/v) possibilitou a separação de duas frações com atividade antimicrobiana, sendo a cefamicina C eluída na primeira fração.

Rodriguez (2011) estudou o processo de troca iônica utilizando a resina Q-Sepharose XL em reatores de mistura, avaliando os efeitos da temperatura e do pH na adsorção e dessorção da cefamicina C. A temperatura de 30°C e pH 6,8 foi a melhor condição experimental para adsorção do antibiótico na resina. Foi proposto um modelo para simulação do processo contínuo utilizando dois reatores de mistura e após otimização, foram definidas as vazões de alimentação do caldo, do eluente e de reciclo de resina que maximizassem os parâmetros de desempenho fator de concentração, fator de purificação, produtividade e rendimento. As vazões ótimas obtidas para cada parâmetro de desempenho variaram bastante entre si. Os resultados da otimização mostraram que o processo contínuo pode ser utilizado com o objetivo de concentrar a cefamicina C, sendo que o valor máximo obtido para o fator de concentração foi 2. Entretanto, a purificação obtida não foi satisfatória, já que o maior fator de purificação obtido foi de 1,06, ou seja, a proporção cefamicina C/contaminantes permaneceu a mesma em relação ao caldo inicial.

Baptista-Neto et al. (2012) avaliaram o processo de purificação em coluna utilizando uma resina neutra, a Amberlite XAD1180, e outra aniônica, a Q-Sepharose XL. Os autores verificaram que o pH influenciou na adsorção da cefamicina C na resina XAD1180.

Em valores de pH próximo à neutralidade (pH 6,8) a cefamicina C foi pouco adsorvida no leite, mas em valores de pH ácidos (pH 3,5 e 2,8) a adsorção foi maior. A eluição foi possível utilizando-se tanto tampão pH 2,8, água ou soluções de etanol 5 ou 10%. A medida da absorbância a 260 nm mostrou a separação de diferentes picos do pico da cefamicina C. No processo de troca iônica, a resina foi capaz de reter a cefamicina no leite, que foi eluída utilizando-se um gradiente de grau de solução de NaCl variando de 0,5 a 5%. Os espectros de RMN de frações coletadas na troca iônica mostraram uma significativa purificação em relação aos espectros do caldo ultrafiltrado.

Após análise dos dados disponíveis na literatura, observou-se que ainda há pouca informação sobre o processo de purificação da cefamicina C. Mas a cefalosporina C, antibiótico que pertence à mesma classe da cefamicina dentro do grupo dos β -lactâmicos, já foi abundantemente estudada e na literatura encontram-se muitos trabalhos sobre a purificação deste composto. Existem vários estudos avaliando os processos de adsorção da cefalosporina, principalmente em resinas poliméricas neutras de poliestireno divinilbenzeno, como as resinas HP20, XAD2, XAD4, XAD16, XAD1180, SP207, SP850 (HICKETIER e BUCHHOLZ, 1990; LEE, JUNG e MOON, 1997; LEE, PARK e MOON, 1997; BARBOZA, HOKKA e MAUGERI, 2002; RAMOS, OTERO e RODRIGUES, 2004). A adsorção em resinas neutras apresentou-se como um processo favorável, sugerindo a possibilidade de aplicação para extração deste antibiótico do caldo de cultivo. Bautista et al. (2006) verificaram a separação da cefalosporina C da desacetilcefalosporina C, um intermediário da rota biossintética com estrutura química muito semelhante à da cefalosporina, utilizando a resina XAD2 modificada quimicamente. O trabalho de Fisher, Maikner e Gehris (2011) também apresentou resultados muito interessantes, mostrando a separação da cefalosporina C da desacetilcefalosporina C e desacetoxicefalosporina C, outro intermediário da rota, utilizando as resinas XAD16 e XAD18.

Conforme mencionado anteriormente, a cefamicina C e a cefalosporina C apresentam estruturas químicas muito semelhantes (Figuras 2.1 e 2.2). Possivelmente, essa semelhança atribui aos dois compostos propriedades físico-químicas bem parecidas, o que pode levar a comportamentos semelhantes em um sistema de adsorção, como no equilíbrio e na cinética. Baseando-se nesta hipótese e nos bons resultados obtidos com a cefalosporina C, a adsorção da cefamicina em resinas poliméricas neutras apresenta-se como um processo possivelmente promissor para extração e purificação deste antibiótico. Atualmente não existe nenhum trabalho publicado sobre a cinética e equilíbrio de adsorção deste antibiótico em

resinas neutras, justificando-se, então, a necessidade de estudos para verificar a aplicabilidade deste processo na purificação da cefamicina C.

O processo de troca iônica também se apresenta como uma técnica interessante para ser utilizada na extração da cefamicina C do caldo de cultivo devido à natureza anfótera da molécula, que apresenta cargas positivas e/ou negativas, dependendo do pH do meio. Os resultados obtidos utilizando a resina aniônica QXL confirmam esta hipótese. O processo em coluna desenvolvido por Bustamante et al. (2008), utilizando a resina QXL, mostrou a separação de duas frações com atividade antimicrobiana, mas a natureza dos compostos presentes nas duas frações não foi identificada. A otimização do processo bem como a avaliação mais criteriosa dos compostos separados ainda falta ser verificada.

Baseado no exposto anteriormente justifica-se a proposta do presente trabalho, que avaliou a purificação da cefamicina C utilizando processos de troca iônica e adsorção em colunas de leito fixo.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 – Materiais

3.1.1- Resinas

Foram utilizadas as resinas poliméricas neutras Amberlite XAD4 e Amberlite XAD16, produzidas pela Rohm and Haas e fornecidas pela Sigma, e a resina de troca aniônica Q Sepharose XL, da GE Healthcare.

A escolha das resinas foi baseada nos resultados de trabalhos anteriores envolvendo processos de purificação da cefamicina C ou da cefalosporina C. A resina Q-Sepharose XL foi utilizada por Bustamante et al. (2008) e Rodriguez (2011), que estudaram o equilíbrio, a cinética e a purificação da cefamicina C nesta resina. A resina Amberlite XAD16 foi utilizada por Ramos, Otero e Rodrigues (2004), e por Fisher, Maikner e Gehris (2011) para extração e purificação da cefalosporina C, enquanto que Martins (2010) estudou a adsorção e dessorção da cefamicina C e contaminantes presentes no caldo de cultivo na resina Amberlite XAD4. Os resultados destes estudos estão descritos em mais detalhes no item 2.4. Como não havia nenhum estudo anterior a respeito do equilíbrio e cinética de adsorção da cefamicina C nas resinas XAD4 e/ou XAD16, os primeiros experimentos com estas resinas envolveram a obtenção de isotermas de adsorção e o estudo da cinética em reatores de mistura. Posteriormente foram realizados os ensaios em colunas de leito fixo. O equilíbrio e a cinética da cefamicina C na resina QXL já foi realizado por Rodriguez (2011). Assim, neste trabalho, foram feitos apenas experimentos em coluna com esta resina, visando melhorar o processo proposto por Bustamante et al. (2008).

As características das resinas são fornecidas pelos fabricantes e encontram-se apresentadas nas Tabelas 3.1 e 3.2.

Tabela 3.1 - Características das resinas poliméricas neutras Amberlite XAD4 e XAD16

Resina	Matriz	Área superficial (m ² /g)	Diâmetro de poro (médio) (Å)	Diâmetro médio (µm)
XAD4	poliestireno/ divinilbenzeno	750	100	640
XAD16	poliestireno/ divinilbenzeno	800	150	700

Tabela 3.2 - Características da resina de troca aniônica Q Sepharose XL

Resina	Matriz	Íon de troca	Partícula (μm)	Diâmetro médio (μm)
QXL	agarose ligada a dextrana	amônio quaternário	45-165	90

3.1.2 – Cartucho para extração em fase sólida (SPE)

Na etapa de extração em fase sólida, ou adsorção no adsorvente C18, foi utilizado um cartucho de 10g fornecido pela Waters, de fase estacionária C18. De acordo com as informações do fabricante, a fase estacionária possui o tamanho de partícula entre 55 e 105 μm e diâmetro de poro de 125 Å.

3.1.3 - Caldo de cultivo

Como não existe o padrão da cefamicina C disponível para ser adquirido, todos os experimentos realizados neste trabalho foram conduzidos utilizando caldo de cultivo contendo o antibiótico. Foram utilizados caldos de cultivo da linhagem bacteriana de *Streptomyces clavuligerus* DSM 41826, cultivadas em biorreator de bancada (4L) em meio contendo derivados de soja e lisina como fontes de nitrogênio e glicerol como fonte de carbono e energia. Os cultivos foram realizados por outros pesquisadores do grupo de pesquisa que tinham como objetivo estudar o processo de produção da cefamicina C. A descrição dos meios de cultivo e do procedimento experimental utilizado para a produção da cefamicina C podem ser vistos em detalhes no trabalho de Bellão et al. (2013).

3.1.4 – Cefalosporina C

O padrão de cefalosporina C utilizado foi o sal de zinco da cefalosporina C, da Sigma.

3.1.5 – Ágar nutriente

O ágar nutriente foi preparado misturando-se os reagentes, na seguinte proporção (g/L): peptona 5,0; extrato de carne 3,0; ágar bacteriológico 15,0; água destilada q.s.p. O pH do meio foi ajustado para 7,2 ($\pm 0,1$) e depois autoclavado à 121°C por 15 min.

3.2 – Metodologia analítica

3.2.1- Determinação da concentração de cefamicina C

A cefamicina C foi analisada e quantificada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e por bioensaio.

3.2.1.1 - Análise da cefamicina C por CLAE

Estas análises foram feitas de acordo com o método proposto por Baptista-Neto et al. (2009). Utilizou-se a coluna C₁₂ Synergi da Phenomenex como fase estacionária e solução de ácido acético 0,01M como eluente. As condições de operação do equipamento foram: temperatura de 28°C, vazão do eluente de 2mL.min⁻¹, regime isocrático, e tempo de injeção de 20 min. A detecção foi feita por UV no comprimento de onda de 254 nm. O pico da cefamicina foi detectado em um tempo aproximado de 10 min. Como não existe padrão de cefamicina C, a curva de calibração foi feita a partir de amostras purificadas contendo cefamicina C. As amostras purificadas foram obtidas após purificação do caldo em coluna de troca iônica, cujo procedimento experimental está descrito no item 3.3.4, e a concentração de cefamicina C nestas amostras foram determinadas por bioensaio quantitativo. Sabendo-se a concentração de cefamicina nas amostras, foi possível construir a curva de calibração.

3.2.1.2 - Análise de cefamicina C por bioensaio quantitativo

A quantificação da cefamicina C por bioensaio foi feita segundo o método proposto por Liras e Martín (2005), utilizando como bactéria-teste a linhagem de *Escherichia coli* ESS 2235, que é sensível à cefamicina. Como padrão, utilizou-se uma solução de cefalosporina C, já que não existe padrão de cefamicina C.

O método é baseado na difusão da solução de antibiótico no ágar previamente semeado com a bactéria-teste, que tem o crescimento inibido nas regiões onde o antibiótico se

difunde. O procedimento experimental utilizado para realização desta análise é descrito a seguir.

O primeiro passo consistiu em cultivar a bactéria-teste em ágar nutriente em um tubo inclinado por 48h, a 36-37°C. Após crescimento, foi preparada uma suspensão bacteriana adicionando-se 10 mL de solução salina (NaCl 0,9%) estéril ao tubo de ensaio. Em seguida, mediu-se a DO da suspensão num comprimento de onda de 600 nm. Com o valor da DO, foi feito o cálculo do volume de suspensão a ser adicionada para cada x mL de ágar nutriente previamente autoclavado, de acordo com a equação 3.1:

$$y = \frac{x}{100 * DO} \quad (3.1)$$

sendo y o volume de suspensão bacteriana a ser adicionada em x mL de agar e DO o valor da absorvância da suspensão bacteriana medida a 600 nm.

O ágar fundido foi inoculado com a suspensão bacteriana a uma temperatura entre 45-50°C, já que temperaturas mais altas podiam matar a bactéria. Depois de inoculado, o ágar foi distribuído em placas de Petri de 150 mm de diâmetro e após solidificação, foram perfurados oito poços equidistantes de aproximadamente 0,5 mm de diâmetro.

O próximo passo consistiu em preparar as soluções do padrão e das amostras. Primeiramente preparou-se uma solução de cefalosporina C de 30 mg/L. Parte desta primeira solução foi diluída obtendo-se outra três vezes menos concentrada. Para cada amostra, também foram utilizadas duas soluções, sendo uma a amostra sem diluição e a outra a amostra diluída com o mesmo fator de diluição entre as soluções de cefalosporina C. De cada solução foram adicionados 20 µL em dois poços da placa de Petri. Em seguida, as placas foram incubadas a 37°C por 24h. Após este período, os halos de inibição correspondentes a cada solução foram medidos e a concentração de cefamicina C, expressa como cefalosporinas totais, foi calculada, de acordo com as equações 3.2 e 3.3.

$$\theta = \frac{(\sum A_H + \sum A_L) - (\sum P_H + \sum P_L)}{(\sum A_H + \sum P_H) - (\sum A_L + \sum P_L)} \cdot \log(\text{fator de diluição}) \quad (3.2)$$

$$C_{amostra} = 10^\theta \cdot \text{concentração mais alta do padrão} \quad (3.3)$$

sendo A e P os diâmetros dos halos de inibição das amostras e dos padrões, respectivamente; H e L representam, respectivamente, as altas e baixas concentrações; o fator de diluição é

razão entre a concentração mais alta e mais baixa das soluções padrões e $C_{amostra}$ é a concentração de cefamicina C na amostra.

Se a amostra estivesse muito concentrada, ela era diluída, e desta solução diluída preparava-se a segunda solução mais diluída, da mesma maneira como realizado com a amostra pura. As duas soluções diluídas eram aplicadas no ágar.

3.2.2 – Detecção de compostos com atividade antimicrobiana – bioensaio qualitativo

A detecção de compostos com atividade antimicrobiana foi feita de maneira similar ao bioensaio quantitativo. O ágar e as placas foram preparados da mesma maneira, mas foram aplicados nas placas apenas as amostras puras, sem o padrão de cefalosporina C. Após incubação das placas, a formação de um halo de inibição indicava a presença de algum composto com atividade antimicrobiana na amostra.

3.2.3- Determinação da concentração de contaminantes

Os contaminantes foram definidos como compostos diferentes da cefamicina C e que estavam presentes no caldo de cultivo ou nas frações purificadas. O caldo continha um número muito grande de contaminantes e provavelmente eram compostos muito diferentes entre si. Como não era possível monitorar a concentração de cada um e grande parte dos contaminantes não eram conhecidos, optou-se pela medida de absorbância como uma medida indireta da concentração destes compostos. Esta medida é capaz de detectar qualquer composto que absorva luz no comprimento de onda selecionado. Neste trabalho, os contaminantes foram definidos como compostos que absorvem luz entre os comprimentos de onda de 310 a 450 nm. A cefamicina C não absorve luz nesta faixa de comprimentos de onda, assim, esta análise não sofre influência da cefamicina e detecta apenas a presença de outros compostos presentes na amostra e que absorvem luz nesta faixa.

A medida de absorbância foi feita em espectrofotômetro, na faixa de comprimento de ondas definida, e a concentração dos contaminantes foi expressa como a área obtida após integração da curva de absorbância versus comprimento de onda.

3.2.4- Determinação da concentração de cefalosporina C

A análise de cefalosporina C foi feita por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Foi utilizada uma coluna C18 MicroBondapak (Waters) como fase estacionária e a fase móvel constituída por tampão KH_2PO_4 (pH6)/acetonitrila, na proporção de 97:3. Foram utilizadas as seguintes condições de operação: temperatura de 40°C, vazão 1 mL/min e detecção no comprimento de onda 254 nm.

3.2.5 – Análises de espectrometria de massas

As frações com bioatividade oriundas da coluna de troca iônica, previamente tratadas em cartucho de SPE C18, foram qualitativamente analisadas por espectrometria de massas. Essas análises foram conduzidas em um sistema constituído por um cromatógrafo líquido de alta eficiência acoplado a um espectrômetro de massas. O cromatógrafo líquido utilizado foi o Thermo Finnigan SurveyorTM, constituído de um injetor automático, quatro bombas e detector PDA, e o espectrômetro de massas foi o Thermo Linear Ion Trap LxQTM. O sistema era controlado pelo programa Xcalibur® (Thermo Electron FinniganTM) que armazenava os dados de cada análise e foi utilizado posteriormente para obtenção dos cromatogramas de íons totais e de pico base. Foi utilizada a coluna Hypersil Gold C18 (dimensões 100 × 4,6 mm, 5 µm de tamanho de partícula) e como fase móvel uma solução de metanol:água na proporção 70:30 (v/v) com 0,1% de ácido acético. A vazão utilizada foi de 0,4 mL/min. A fonte de ionização do espectrômetro de massas era do tipo ESI (“Electrospray Ionization”) e foi operada no modo positivo. A temperatura do capilar foi mantida a 300°C e a voltagem aplicada na fonte de ionização e no capilar foram de 5 kV e 3 V, respectivamente. As vazões dos gases de bainha, auxiliar e de varrimento utilizadas foram, respectivamente, 70, 30 e 3 unidades.

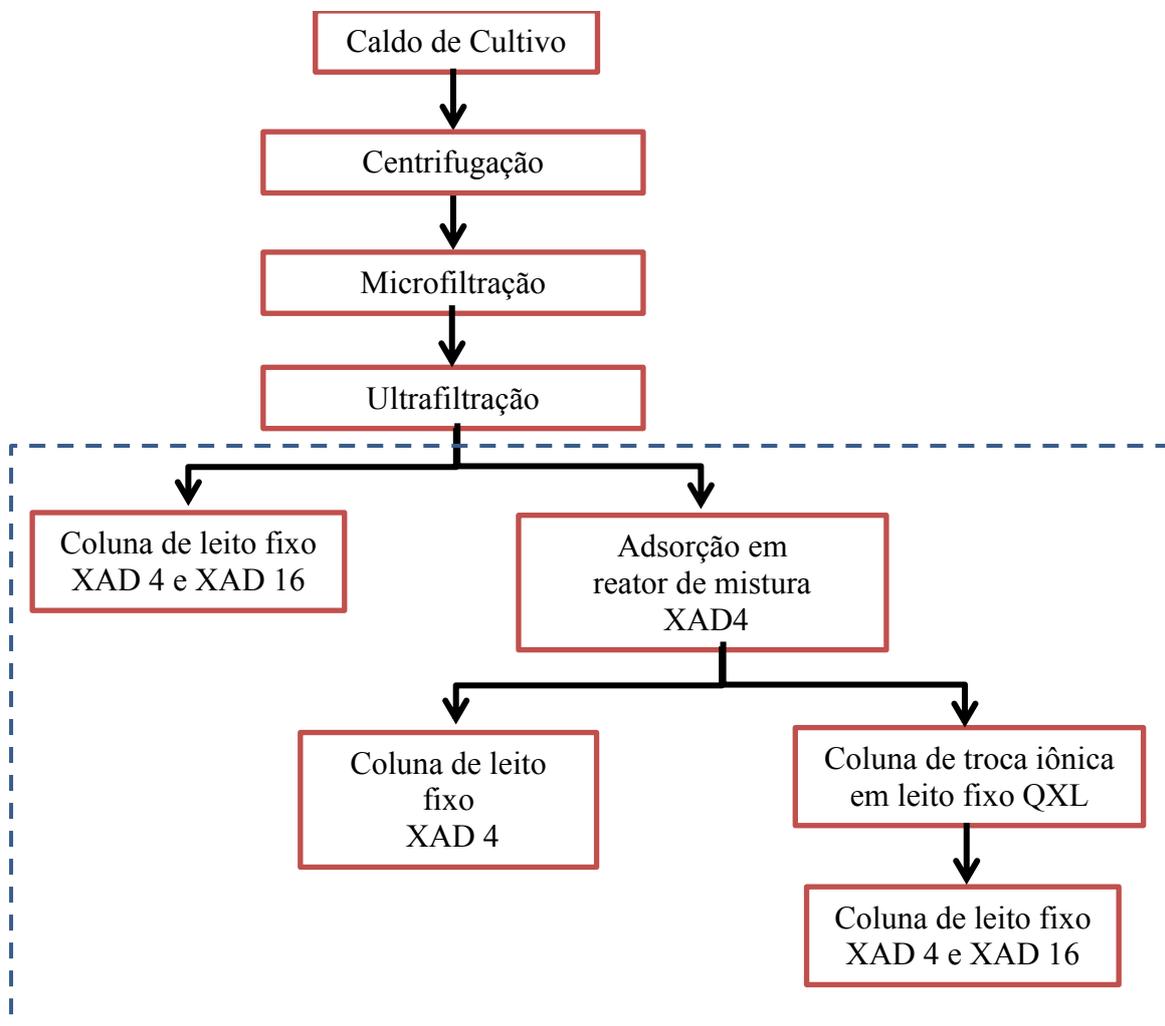
As análises de espectrometria de massas foram realizadas no Centro de Química, da Universidade do Minho, em Braga, Portugal, como parte do trabalho de doutorado-sanduiche desenvolvido no Centro de Engenharia Biológica, também da Universidade do Minho. O doutorado-sanduiche foi realizado em colaboração com os professores Jose António Teixeira, do Centro de Engenharia Biológica, e Pier Parpot, do Centro de Química. Apenas os experimentos em coluna de troca iônica foram realizados durante o doutorado-sanduiche, por isto as frações dos ensaios em coluna com as resinas neutras XAD4 e XAD16 não passaram por esta análise.

3.3- Procedimento experimental

A Figura 3.1 ilustra as etapas de purificação utilizadas neste trabalho por meio de um fluxograma, sendo que aquelas contidas na área demarcada foram os focos de estudo deste trabalho.

A escolha das etapas e as sequências adotadas são detalhadas na sequência, conforme cada procedimento experimental é apresentado.

Figura 3.1 - Fluxograma dos processos de purificação utilizados



3.3.1- Pré-tratamento do caldo de cultivo

Ao término do cultivo, o caldo foi centrifugado a uma temperatura de 4°C e 3220 g. O sobrenadante foi microfiltrado em membrana de poro 0,2µm, e o caldo

microfiltrado foi posteriormente ultrafiltrado em membrana com 3 KDa de tamanho de poro, utilizando módulos de filtração da GE contendo 3.600 cm² e 110 cm² de área de membrana, respectivamente.

Os caldos ultrafiltrados foram armazenados à -80°C para uso posterior nos ensaios de adsorção.

As etapas de centrifugação, microfiltração e ultrafiltração foram utilizadas para uma clarificação inicial do caldo e promoveram a remoção de insolúveis (células e fragmentos celulares, resíduos da farinha de soja utilizada no meio de cultivo), algumas proteínas e outras macromoléculas de tamanho molecular maior que 3 KDa. A retirada de insolúveis é uma etapa importante já que evita o entupimento do leito nos processos em coluna.

3.3.2 – Pré-tratamento das resinas

3.3.2.1 – Pré-tratamento das resinas Amberlite XAD4 e Amberlite XAD16

O pré-tratamento das resinas XAD4 e XAD16 foi feito em béquer, sob agitação, e consistiu dos seguintes passos:

- três lavagens sucessivas da resina com solução de metanol 50%, na proporção 3:1 de volume de solvente/volume de resina.
- três lavagens sucessivas com água deionizada, também na proporção 3:1 volume água/volume de resina.
- três lavagens sucessivas com etanol, na mesma proporção solvente/resina das lavagens anteriores.

Cada lavagem teve duração aproximada de 30 min. Caso a resina não fosse utilizada imediatamente, ela era armazenada em solução de EtOH 50%. Antes de cada experimento de adsorção, a resina era lavada exaustivamente com água para remoção do etanol. Foram feitas pelo menos dez lavagens com água deionizada, numa proporção em volume de 10:1 (água:resina), com duração de aproximadamente 10 min, para garantir a remoção do etanol.

3.3.2.2 – Pré-tratamento da resina Q Sepharose XL

A resina QXL foi tratada em coluna. A limpeza da resina foi feita passando-se três vezes o volume do leito de uma solução 0,5 N NaOH + 1 M NaCl, vazão de 5 mL/min.

Em seguida, passou-se duas vezes o volume do leito de água deionizada. Para regeneração da resina, utilizou-se solução de ácido acético 25% correspondente a um volume de leito. Antes de ser usada nos experimentos de adsorção, a resina era lavada com água deionizada, entre 4 a 5 vezes o volume do leito, para remoção do ácido acético.

3.3.3 – Pré-tratamento do caldo ultrafiltrado e obtenção do caldo clarificado

Esta etapa teve como objetivo a retirada de contaminantes coloridos presentes no caldo para futura alimentação da coluna de troca iônica QXL. Segundo Baptista-Neto et al. (2012) esta etapa deve ser realizada porque alguns compostos coloridos adsorvem irreversivelmente na resina QXL, causando a perda da mesma. Este ensaio foi feito com o caldo ultrafiltrado em pH entre 6,6-6,8 e apenas para a resina XAD4, como proposto por Bustamante et al. (2008).

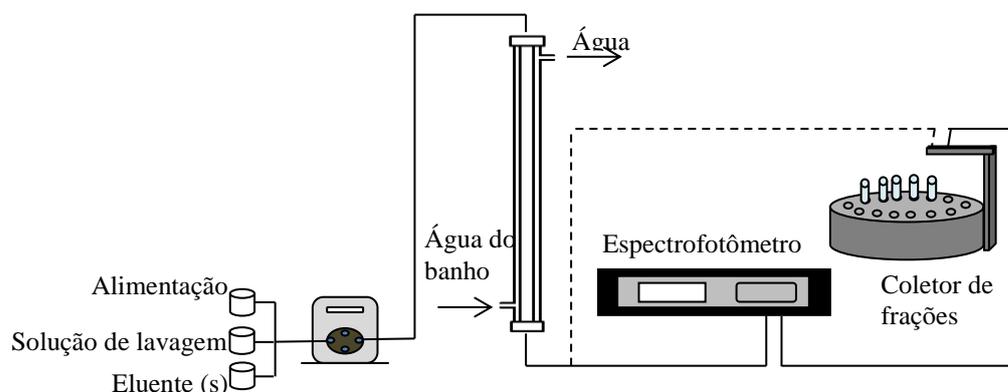
O procedimento foi feito em reator de mistura, à 20°C e agitação de 500 RPM. A relação caldo/resina utilizada foi de 3:1, em volume e o tempo de adsorção foi de 1h. Amostras foram retiradas em intervalos de tempo definidos para determinação da cefamicina C e contaminantes. Ao final, o caldo resultante deste processo, chamado de caldo clarificado, foi recolhido e armazenado à -80°C para uso posterior nos ensaios em coluna de troca iônica e de adsorção com a resina XAD4.

3.3.4- Experimentos de troca iônica em coluna de leito fixo empacotada com a resina Q Sepharose XL

Os ensaios de troca iônica foram divididos em dois grupos de experimentos, sendo o primeiro formado pelos ensaios CQ1, CQ2 e CQ3, e o segundo pelos ensaios CQ2 e CQ4 (Tabela 3.3). O primeiro teve como objetivo avaliar a influência da vazão na retenção da cefamicina C no leito durante a etapa de alimentação da coluna e na eluição. Para isso, foram obtidas curvas de ruptura em diferentes vazões de alimentação da coluna e calculados as eficiências do processo. O modo de eluição foi o mesmo para todos os ensaios. No segundo grupo de experimentos, foram avaliados dois métodos de eluição diferentes, mantendo-se a vazão constante.

O aparato experimental pode ser visto na Figura 3.2 e a Tabela 3.3 apresenta os parâmetros operacionais de cada ensaio realizado.

Figura 3.2 - Aparato experimental utilizado nos experimentos em coluna de leito fixo.



Fonte: Adaptado de Silva (2010).

Tabela 3.3: Parâmetros de operação dos experimentos de troca iônica em coluna de leito fixo com a resina QXL

Experimento	Volume do leito (mL)	Vazão (mL/min)	Alimentação*	Lavagem	Eluição % NaCl (m/v)
CQ1	20,1	2,5	45 mL CC** (96,97 mg/L) pH 6,6	150 mL água deionizada	Gradiente degrau (400 mL) NaCl 0,1%; NaCl 0,3 %, NaCl 0,5%
CQ2	20,4	5	48 mL CC** (95,01 mg/L) pH 6,6	150 mL água deionizada	Gradiente degrau (400 mL) NaCl 0,1%; NaCl 0,3 %, NaCl 0,5%
CQ3	20,1	7,5	45,5 mL CC** (105,2 mg/L) pH 6,6	150 mL água deionizada	Gradiente degrau (400 mL) NaCl 0,1%; NaCl 0,3 %, NaCl 0,5%
CQ4	21,3	5	40 mL CC** (237,02 mg/L) pH 6,7	100 mL água deionizada	Isocrático NaCl 1% (300 mL)

*Os valores de concentração entre parênteses correspondem às concentrações de cefamicina C na alimentação.** Caldo clarificado.

Em todos os ensaios foi utilizada uma coluna encamisada de diâmetro interno de 1 cm. Uma bomba peristáltica, previamente calibrada, bombeava as soluções de alimentação, lavagem e eluição para a entrada da coluna. A saída da coluna era ligada a um coletor de frações automático, onde as frações eram recolhidas em tubos de ensaio. No experimento CQ4, antes de chegar ao coletor de frações, o efluente da coluna passava pelo

espectrofotômetro, que fazia as medidas de absorção em três comprimentos de onda, 254, 280, 310 nm, a cada 10 segundos. De cada fração eram retiradas amostras para as análises de cefamicina C, contaminantes e bioensaio qualitativo. A temperatura da camisa da coluna foi mantida à 20°C em todos os ensaios, por meio de um banho termostático.

Nos experimentos de ruptura (CQ1, CQ2 e CQ3), as frações da alimentação e as frações iniciais da lavagem foram coletadas manualmente, em frascos Eppendorfs, porque o volume de cada fração foi de apenas 2 mL. Após a ruptura, a saída da coluna foi reconectada ao coletor de frações e as amostras subsequentes foram coletadas automaticamente em tubos de ensaio.

As frações contendo cefamicina C foram congeladas à -80°C, concentradas em liofilizador e depois armazenadas à -80°C para posterior uso nos ensaios em coluna com as resinas XAD4 e XAD16 ou para extração em fase sólida. Estas frações foram chamadas de fração 1 (F1).

3.3.5- Adsorção em cartucho SPE utilizando a fase estacionária C18

A extração em fase sólida foi utilizada para retirar o sal das frações oriundas da coluna de troca iônica para que estas pudessem ser analisadas por espectrometria de massas. A extração foi feita utilizando-se cartuchos de fase estacionária C18, previamente tratados aplicando-se, em sequência, 50 mL de metanol e 30 mL de água deionizada. As frações liofilizadas F1 foram ressuspensas em 10 mL de água deionizada, tamponadas para pH 2,6 (tampão citrato/fosfato) e aplicadas no cartucho. Em seguida, o cartucho foi lavado com 30 mL de água deionizada para retirada de compostos não adsorvidos e então foi feita a eluição com 50 mL de solução de metanol 50% (v/v). Frações de 4 mL foram coletadas na saída do cartucho para determinação da cefamicina C e para as análises de espectrometria de massas.

3.3.6- Experimentos de isotermas de adsorção

Os experimentos de isotermas foram realizados com as resinas XAD4 e XAD16, avaliando o efeito da temperatura e do pH no equilíbrio de adsorção da cefamicina C nestas resinas. Foram avaliados três temperaturas - 15, 20 e 30°C - e três valores de pH do caldo - 2,6; 4,6 e 6,6. Para a resina XAD4, também foram obtidas isotermas nos valores de pH 3,8; 5,6 e 7,5 na temperatura de 20°C. Para atingir o valor de pH desejado, foi utilizado o tampão citrato/fosfato e, quando necessário, foi adicionada solução de HCl 5M para ajustar o

pH. Não foram obtidas isotermas para a resina Q Sepharose XL já que estes experimentos já tinham sido realizados por outros pesquisadores e os resultados do estudo podem ser vistos no trabalho de Rodriguez, Hokka e Barboza (2010).

Nestes ensaios, uma massa determinada de resina pré-tratada foi pesada em frascos cilíndricos e em seguida um volume conhecido de caldo ultrafiltrado tamponado contendo diferentes concentrações iniciais de cefamicina C foi adicionado a cada frasco. A proporção de caldo/resina utilizada foi de 0,3g resina/5 mL de caldo. Para obtenção de diferentes concentrações de cefamicina C inicial, o caldo ultrafiltrado foi diluído com água deionizada. Os frascos foram colocados sob agitação (150 RPM) em mesa incubadora rotativa a uma temperatura fixa por 1h, até que o equilíbrio fosse atingido. O tempo necessário para atingir o equilíbrio foi determinado em estudos anteriores de cinética de adsorção da cefamicina C na resina XAD4 (MARTINS, 2010). Foram retiradas amostras dos caldos antes de entrarem em contato com a resina e ao final do experimento para quantificação da cefamicina C.

As isotermas foram expressas em gráficos de q^* , que corresponde à concentração de cefamicina C na fase sólida, no equilíbrio, em função de C^* , que corresponde à concentração do antibiótico na fase líquida, também no equilíbrio. O valor de q^* foi calculado de acordo com a equação 3.4.

$$q^* = \frac{C_0 - C^*}{m} \quad (3.4)$$

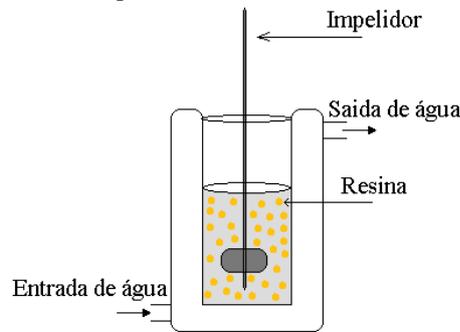
em que C_0 é a concentração inicial de cefamicina C no caldo (mg/L) e m a massa de resina utilizada (g).

Os dados experimentais foram ajustados aos modelos de equilíbrio de adsorção de Langmuir e linear. Para o modelo de Langmuir, foi feito um ajuste não-linear utilizando o programa OriginPro 8[®], que utiliza o algoritmo de Levenberg-Marquardt para ajuste iterativo dos parâmetros. O modelo linear foi ajustado no mesmo programa, utilizando o método dos mínimos quadrados.

3.3.7- Experimentos de cinética de adsorção e de dessorção da cefamicina C em reator de mistura

Os estudos cinéticos foram conduzidos em reator de mistura encamisado, sob agitação de 500 RPM e temperatura de 20°C. O aparato experimental utilizado nestes experimentos é mostrado na Figura 3.3.

Figura 3.3 - Reator de mistura utilizado para retirada de contaminantes de caldo de cultivo ultrafiltrado.



Fonte: Silva (2010).

Os experimentos foram realizados com as resinas XAD4 e XAD16 e utilizou-se o caldo ultrafiltrado tamponado (tampão citrato/fosfato) em pH~2,6, já que esta condição de pH maximiza a adsorção da cefamicina C nestas resinas. Não foram feitos ensaios de cinética com a resina QXL porque este estudo já foi realizado por Rodriguez, Hokka e Barboza (2010).

Na etapa de adsorção, 100 mL de caldo e 8g de resina pré-tratada foram adicionados ao reator e mantidos sob agitação até que o equilíbrio fosse atingido (1 h). Ao final, o líquido resultante foi retirado, mantendo-se a resina, e seguiram-se duas etapas de lavagem para retirada de compostos não retidos presentes nos espaços vazios entre as partículas de resina. As lavagens foram feitas adicionando-se 100 mL de água deionizada ao reator e deixando o sistema em agitação por 10 min. Ao final, o líquido foi retirado para dar início ao processo de dessorção. Para isso, adicionou-se 100 mL de solução de etanol 15% ao reator, que foi mantido sob agitação até que o equilíbrio fosse atingido (1 h). Nas etapas de adsorção e dessorção, amostras foram retiradas em intervalos de tempo pré-definidos para análises da cefamicina C. Nas etapas de lavagem, as amostras foram retiradas apenas ao final.

Os resultados dos experimentos cinéticos foram expressos em gráficos de C/C_0 e q em função do tempo, sendo C e q as concentrações de cefamicina C na fase líquida e na fase sólida, respectivamente. O valor de q foi calculado de acordo com a equação 3.5.

$$q = \frac{C_0 - C}{m} \quad (3.5)$$

sendo C_0 a concentração de cefamicina C inicial e m a massa de resina adicionada ao reator.

Os resultados das cinéticas foram utilizados para estimativa dos parâmetros cinéticos intrínsecos e de transferência de massa nas duas resinas, e assim verificar se a diferença no tamanho de poro entre as duas resinas leva a alguma diferença na dinâmica do processo. Para estimativa dos parâmetros, foi feito o ajuste dos resultados experimentais a dois modelos cinéticos, descritos nos itens 4.3.1 e 4.3.2, no capítulo de Resultados e Discussão.

3.3.8- Experimentos em colunas de leito fixo empacotadas com a resina Amberlite XAD4 e Amberlite XAD16

O procedimento experimental utilizado nas colunas empacotadas com as resinas XAD4 e XAD16 foi semelhante ao procedimento realizado na troca iônica. O aparato experimental foi o mesmo e a temperatura também foi mantida à 20°C. Nestes ensaios, o efluente da coluna passava pelo espectrofotômetro para realização de medidas de absorvância nos comprimentos de onda 254, 280 e 310 nm.

Nos ensaios realizados com a resina XAD4 foram avaliados a influência da concentração inicial de cefamicina C na adsorção no leito, por meio da obtenção de curvas de ruptura (CX1 e CX2, Tabela 3.4). Avaliou-se também a separação e purificação da cefamicina C ao aplicar na coluna caldos ou frações em diferentes estágios de purificação: caldo ultrafiltrado (CX3), caldo clarificado (CC) (CX4), fração obtida na troca iônica (F1) (CX5) e F1 adicionado de cefalosporina C (CX7). A cefalosporina C foi adicionada à fração purificada F1 para simular a presença de alguns contaminantes que estão presentes no caldo de cultivo, em quantidades muito pequenas. Estes contaminantes são intermediários da rota de biossíntese da cefamicina C (desacetilcefalosporina C, desacetoxicefalosporina C e penicilina N) e possuem estruturas químicas bem semelhantes entre si e a da cefamicina. Como a concentração destes é muito baixa, para avaliar a separação e purificação seria necessário adicioná-los ao caldo de forma a se tornarem quantitativamente mensuráveis e, além disso, dispor de uma metodologia analítica de quantificação. Mas como não existe o padrão analítico destes compostos disponíveis para serem adquiridos, optou-se por introduzir um composto com estrutura química semelhante aos contaminantes cuja aquisição e quantificação fossem possíveis. Por isso a cefalosporina C foi escolhida. Assim, foi possível avaliar se o processo seria capaz de separar moléculas com estruturas químicas muito parecidas. Ainda com a resina XAD4, também foram avaliados dois métodos de eluição da coluna (CX1 e CX3).

Baseado nos resultados dos ensaios em coluna com a resina XAD4, apenas alguns experimentos foram repetidos com a resina XAD16, verificando a purificação obtida ao aplicar na coluna o caldo ultrafiltrado (CX8), a F1 (CX9) e a F1 adicionada de cefalosporina C (CX10) (Tabela 3.5).

As condições operacionais utilizadas em cada ensaio são mostradas nas Tabelas 3.4 e 3.5.

Tabela 3.4: Parâmetros de operação dos experimentos em coluna de leito fixo com a resina XAD4

Experimento	Volume do leito (mL)	Vazão (mL/min)	Alimentação *	Lavagem	Eluição
CX1	16,3	5	146 mL Caldo ultrafiltrado (157,96 mg/L) pH 3,42	300 mL tampão citrato/fosfato pH 2,72	Gradiente degrau 10 mL EtOH 1%; 10 mL EtOH 2%; 600 mL EtOH 5%
CX2	16,9	5	200 mL Caldo ultrafiltrado (357,13 mg/L) pH 2,8	-	-
CX3	33,1	5	40 mL Caldo ultrafiltrado (120,73 mg/L) pH 2,81	150 mL tampão citrato/fosfato pH 2,87	Gradiente degrau 400 mL EtOH 1%; 400 mL EtOH 2%; 400 mL EtOH 3%
CX4	33,9	5	40 mL Caldo clarificado (64,22 mg/L) pH 3,29	100 mL Tampão citrato/fosfato pH 2,6	Isocrático 400 mL EtOH 1%
CX5	20,2	5	13,4 mL F1 (113,02 mg/L) pH 2,61	100 mL tampão citrato/fosfato pH 2,63	Gradiente degrau 400 mL EtOH 1%; 400 mL EtOH 2%; 400 mL EtOH 3%
CX6**	27,6	5	16,0 mL F1 (132,45 mg/L) + cefalosporina C pH 2,77	150 mL tampão citrato/fosfato pH 2,72	Gradiente linear 450 mL EtOH 0-9%
CX7**	27,48	5	16,0 mL F1 (124,87 mg/L) + cefalosporina C pH 2,81	200 mL tampão citrato/fosfato pH 2,72	Gradiente degrau 300 mL EtOH 1%; 300 mL EtOH 3%

*Os valores de concentração entre parênteses correspondem às concentrações de cefamicina C na alimentação.

**As concentrações de cefalosporina C na alimentação para os experimentos CX6 e CX7 foram, respectivamente, 28,3 mg/L (17,6%) e de 26,42 mg/L (17,5 %).

A massa de cefalosporina C adicionada à F1 foi escolhida baseada no trabalho de Fisher, Maikner e Gehris (2011). De acordo com estes autores, o caldo inicial continha 79% de cefalosporina C, 17% de desacetilcefalosporina C e 4% de desacetoxicefalosporina C. Assim, procurou-se trabalhar em uma faixa de concentração de contaminantes, que neste estudo foi a cefalosporina C, entre 15 e 20% em relação à concentração total de cefamicina+cefalosporina.

Tabela 3.5 - Parâmetros de operação dos experimentos em coluna de leito fixo com a resina XAD16

Experimento	Volume do leito (mL)	Vazão (mL/min)	Alimentação*	Lavagem	Eluição
CX8	26,9	5	40,0 mL Caldo ultrafiltrado (288,09 mg/L) pH 2,6	200 mL tampão citrato/fosfato pH 2,63	Gradiente degrau 400 mL EtOH 1%; 400 mL EtOH 2%; 400 mL EtOH 3%
CX9	27,1	5	15,5 mL F1 (71,73 mg/L) pH 2,53	200 mL tampão citrato/fosfato pH 2,57	Gradiente degrau 400 mL EtOH 1%; 400 mL EtOH 2%; 400 mL EtOH 3%
CX10**	27,3	5	17,0 mL F1 (164,86mg/L) + cefalosporina C pH 2,51	200 mL tampão citrato/fosfato pH 2,65	Gradiente degrau 300 mL EtOH 1%; 300 mL EtOH 3%

*Os valores de concentração entre parênteses correspondem às concentrações de cefamicina C na alimentação.

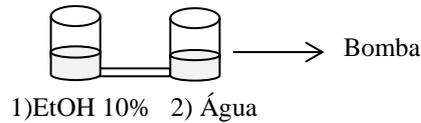
**A concentração de cefalosporina C na alimentação para o experimento CX10 foi de 29,29 mg/L (15%).

Nos experimentos de ruptura (CX1 e CX2), as frações da alimentação e as frações iniciais da lavagem foram coletadas manualmente, em tubos falcon, em um volume de 5 mL cada. As frações seguintes foram coletadas pelo coletor de frações em tubos de ensaio.

Amostras de cada fração foram retiradas para análises de cefamicina C, cefalosporina C, quando presente, e bioensaio qualitativo.

Para o experimento CX6, em que foi feita a eluição no modo gradiente linear, o eluente bombeado para a coluna era proveniente de um aparato de vasos comunicantes (Figura 3.4), como descrito por Silva (2010).

Figura 3.4 - Sistema de vasos comunicantes utilizados na eluição em modo gradiente linear



Fonte: Silva (2010)

Um béquer contendo solução de etanol 10% (v/v) era conectado por mangueira a outro béquer contendo água deionizada, e deste último saía outra mangueira que levava a solução eluente para a entrada da coluna, com o auxílio de uma bomba. Os dois béqueres foram mantidos sob agitação durante toda a etapa de eluição, para garantir a completa homogeneização da solução. Conforme o nível do béquer 2 ia diminuindo, parte da solução do béquer 1 fluía para o béquer 2, de forma a igualar o nível entre os dois. Desta forma, a concentração de etanol no béquer 2 ia aumentando gradativamente. Quando os diâmetros dos dois béqueres e os volumes iniciais de solução são iguais, o balanço de massa no sistema fornece equação 3.6 para o cálculo da concentração de etanol no béquer 2, em função do tempo:

$$C_{\text{EtOH}_2}(t) = C_{\text{EtOH}_1} * \left(\frac{F * t}{2V_0} \right) \quad (3.6)$$

sendo C_{EtOH_2} a concentração de etanol no béquer 2; C_{EtOH_1} a concentração de etanol no béquer 1; F a vazão de eluição e V_0 é o volume inicial de solução nos béqueres.

3.4 – Metodologias de análise dos resultados – parâmetros quantitativos

3.4.1 – Fator de purificação

O fator de purificação representa a relação entre as concentrações do composto que se quer purificar e dos contaminantes presentes, antes e depois da etapa de purificação. O cálculo é dado pelas equações 3.7 e 3.8, e deve ser feito em relação a cada contaminante monitorado.

$$FP = \frac{C/C_{cont}}{C_0/C_{0cont}} \quad (3.7)$$

Simplificando:

$$FP = \frac{C * C_{0cont}}{C_{cont} * C_0} \quad (3.8)$$

sendo C_0 e C as concentrações de cefamicina C iniciais e ao final do processo, e C_{0cont} e C_{cont} as concentrações de contaminantes inicial e final, respectivamente.

Desta forma, se o FP for maior que 1 significa que houve uma redução na concentração do contaminante em relação à concentração do composto que se quer purificar, após a etapa de purificação. O contrário ocorre caso o FP seja menor do que 1. Se o FP for igual a 1, nenhuma purificação foi alcançada.

Este cálculo foi realizado na etapa de pré-tratamento do caldo ultrafiltrado e obtenção do caldo ultrafiltrado (Item 3.3.3), já que foi o único experimento em que a concentrações dos contaminantes no caldo inicial e final foram medidas.

3.4.2 – Fator de concentração

O fator de concentração (FC) informa se a etapa de purificação utilizada foi capaz de promover uma concentração do composto de interesse ou promoveu uma diluição. Ele é calculado de acordo com a equação 3.9.

$$FC = \frac{C}{C_0} \quad (3.9)$$

sendo C_0 e C as concentrações de cefamicina C iniciais e ao final do processo.

Assim como o FP, o FC foi determinado apenas para a etapa de pré-tratamento do caldo ultrafiltrado e obtenção do caldo ultrafiltrado (Item 3.3.3).

3.4.3 – Fator de recuperação

O fator de recuperação (FR) é uma medida do quanto do composto de interesse foi recuperado após a etapa de purificação, em relação à quantidade inicial alimentada ou adicionada ao processo. Ele é calculado de acordo com a equação 3.10.

$$FR = \frac{\sum C_i * V_i}{C_0 * V} \quad (3.10)$$

sendo C_0 e C_i as concentrações de cefamicina C iniciais e em cada fração coletada no ensaio, V é o volume do caldo alimentado ou adicionado ao processo, e V_i os volumes de cada fração coletada.

O FR foi calculado para os experimentos em coluna. Nestes ensaios, foram coletadas várias frações durante as etapas de alimentação, lavagem e eluição, e assim obteve-se o valor do FR para cada etapa e o valor global.

3.4.4 – Avaliação quantitativa das curvas de ruptura

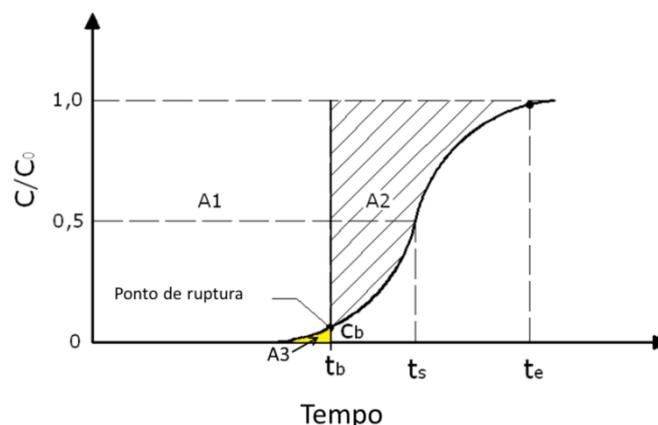
As curvas de ruptura foram obtidas por meio da construção de gráficos descrevendo a variação da concentração na saída da coluna no decorrer do experimento, durante a alimentação e parte da lavagem do leito. Esta variação de concentração foi expressa como C/C_0 , sendo C e C_0 as concentrações na saída da coluna e na alimentação, respectivamente. Destas curvas, algumas variáveis como capacidade de adsorção da resina e utilização do leito foram calculadas, podendo assim determinar as eficiências e produtividades dos processos avaliados.

A capacidade total ou estequiométrica do leito empacotado, se a coluna estiver em equilíbrio com a alimentação, pode ser obtida através da área entre a curva e a linha onde C/C_0 igual a 1 (Figura 3.5). Esta capacidade é obtida em termos do tempo equivalente para atingir a capacidade total do leito, denominado de t_t , e pode ser calculada de acordo com a equação 3.11 (GEANKOPLIS,1993).

$$t_t = \int_0^{t_e} \left(1 - \frac{C}{C_0}\right) dt \quad (3.11)$$

sendo t_e o primeiro instante de tempo em que $C/C_0 \approx 1$.

Figura 3.5 Representação teórica de uma curva de ruptura em coluna de leito fixo



Fonte: Adaptado de Cren et al. (2009)

A partir da equação 3.11 é possível calcular a quantidade de cefamicina C adsorvida por volume de leito da coluna até a sua saturação, de acordo com a equação 3.12,

$$q_t = \frac{C_0 * Q}{VL} t_t \quad (3.12)$$

sendo Q a vazão de alimentação da coluna e VL o volume do leito.

A capacidade utilizada do leito corresponde à capacidade utilizada até o ponto de ruptura, no tempo t_b , que neste trabalho foi considerado o tempo no qual $C/C_0=0,1$. Esta capacidade pode ser calculada pelas equações 3.13 e 3.14,

$$t_u = \int_0^{t_b} \left(1 - \frac{C}{C_0}\right) dt \quad (3.13)$$

$$q_b = \frac{C_0 * Q}{VL} * \int_0^{t_b} \left(1 - \frac{C}{C_0}\right) dt \quad (3.14)$$

em que t_u é o tempo equivalente a capacidade utilizada ou o tempo no qual o efluente atinge a máxima concentração permitida de soluto e q_b é quantidade de cefamicina C adsorvida por volume de leito até o ponto de ruptura. O valor de t_u é geralmente muito próximo de t_b .

A razão t_u/t_t é a fração da capacidade total do leito ou da altura utilizada até o ponto de ruptura. Sendo H_t a altura total do leito e H_b a altura utilizada até o ponto de ruptura, tem-se:

$$H_b = \frac{t_u}{t_t} H_t \quad (3.15)$$

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

$$H_{unb} = \left(1 - \frac{t_u}{t_t}\right) H_t \quad (3.16)$$

O H_{unb} depende da velocidade do fluido e essencialmente independe da altura total da coluna. O valor de H_b é diretamente proporcional a t_b . Então a altura H_{unb} da zona de transferência de massa é simplesmente somada a altura H_b necessária e obtém-se a altura total H_t .

$$H_t = H_{unb} + H_b \quad (3.17)$$

Com o objetivo de avaliar a eficiência do processo foi utilizado o método de cálculo proposto por Cren et al. (2009). As curvas de ruptura foram divididas em diferentes áreas associadas à capacidade de adsorção da resina, como mostrado na Figura 3.5. A_1 está associada com a capacidade utilizada da resina antes do ponto de ruptura, no tempo t_b . A_3 está relacionada com a quantidade de soluto não adsorvido que sai da coluna antes que o ponto de ruptura seja atingido. A_2 está relacionada à capacidade da resina utilizada de uma maneira não eficiente, já que este momento do processo acontece depois do tempo de ruptura mas antes de atingir a saturação do leito, no tempo t_e . Com base nestas áreas, duas eficiências diferentes podem ser calculadas: ϕ_1 , que é a eficiência de utilização do leito, e ϕ_2 , que é a eficiência de remoção do soluto ou a eficiência relacionada à capacidade de retenção do soluto no leito. Estas eficiências e a produtividade são definidas pelas equações 3.18, 3.19 e 3.20 (GEANKOPLIS,1993, CREN et al. 2009).

$$\phi_1 = \frac{t_u}{t_t} = \frac{A_1}{A_1+A_2} \quad (3.18)$$

$$\phi_2 = \frac{t_u}{t_b} = \frac{A_1}{A_1+A_3} \quad (3.19)$$

$$P = \frac{t_t}{t_e} C_0 Q \quad (3.20)$$

3.4.5 – Determinação dos momentos cromatográficos e eficiências de separação

Para comparar as eficiências dos diferentes processos em coluna realizados na purificação da cefamicina C, utilizou-se a metodologia proposta por Lu e Lee (1987) que utilizaram o método dos momentos para avaliar a eficiência de separação entre dois compostos.

O método dos momentos baseia-se na análise do primeiro e segundo momentos estatísticos dos picos cromatográficos. O primeiro momento, μ , é calculado de acordo com a equação 3.21 e representa o tempo de retenção médio do adsorbato no adsorvente. O segundo momento, σ^2 , calculado pela equação 3.22, está relacionado diretamente à largura do pico, ou variância, e é resultado dos efeitos combinados de dispersão axial e das resistências à transferência de massa oferecidas pelos poros do adsorvente e pelo filme líquido externo à partícula (LU e LEE, 1987; SCHWANKE, 2003).

$$\mu = \frac{\sum_i^n C_i t_i \Delta t_i}{\sum_i^n C_i \Delta t_i} \quad (3.21)$$

$$\sigma^2 = \frac{\sum_i^n C_i (t_i - \mu)^2 \Delta t_i}{\sum_i^n C_i \Delta t_i} \quad (3.22)$$

em que C_i é a concentração do adsorbato na fração i , t_i é o tempo no qual a fração i sai da coluna e Δt_i é o intervalo de tempo entre as frações adjacentes.

A eficiência de separação (ES) entre dois componentes é obtida a partir valores de μ e σ^2 de cada componente, de acordo com a equação 3.23:

$$(ES)_{12} = \frac{\Delta t_{12}}{\sigma_{12}} \quad (3.23)$$

em que:

$$\Delta t_{12} = |\mu_1 - \mu_2| \quad (3.24)$$

$$\sigma_{12} = (\sigma_1 \sigma_2)^{1/2} \quad (3.25)$$

Neste trabalho foram calculadas as eficiências de separação entre o pico da cefamicina C e do pico correspondente à medida de absorção no comprimento de onda de 310 nm, que, como explicado anteriormente, é uma medida indireta de contaminantes presentes no caldo, já que a cefamicina C não absorve luz neste comprimento de onda. Também foram calculadas as eficiências de separação entre os picos da cefamicina C e da cefalosporina C para os ensaios em que este antibiótico foi adicionado na alimentação.

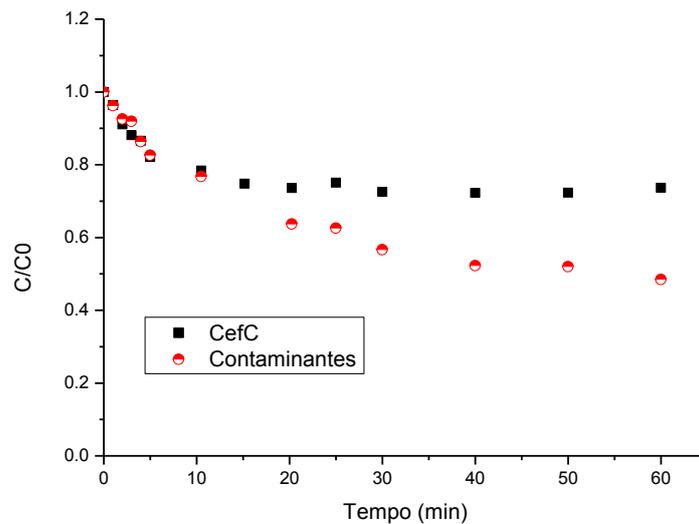
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1- Purificação da Cefamicina C em coluna de leito fixo com a resina Q Sepharose XL

O processo de purificação proposto por Bustamante et al. (2008), que engloba uma etapa de adsorção em resina neutra para retirada de contaminantes seguida de troca iônica em coluna de leito fixo, foi reproduzido. Como a etapa de troca iônica apresentou resultados interessantes de purificação, foram feitas curvas de ruptura para tentar melhorar a produtividade do processo e também foram feitas modificações na eluição da coluna. Os resultados são apresentados a seguir.

A Figura 4.1 apresenta os resultados de adsorção da cefamicina C e contaminantes em reator de mistura, em resina XAD4, à 20°C e pH 6,6.

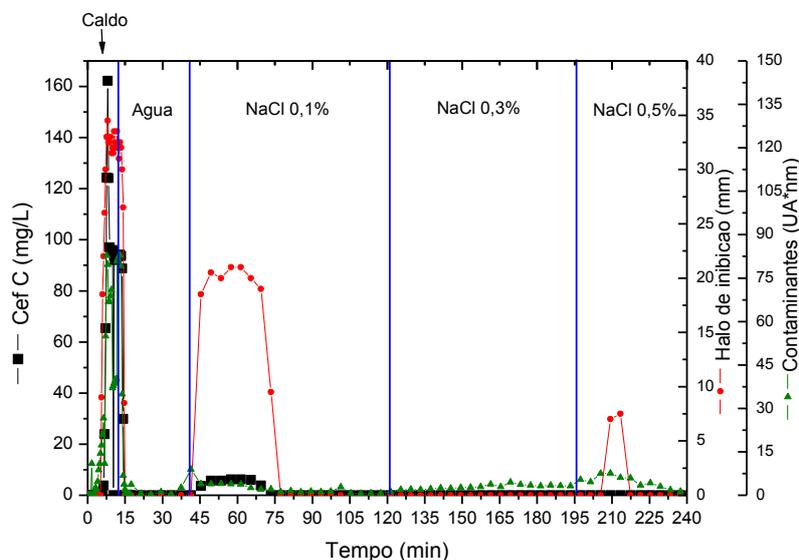
Figura 4.1 - Adsorção da cefamicina C e contaminantes na resina XAD4 em reator de mistura, à 20°C, pH 6,6.



Nesta operação, 27% da cefamicina C foi adsorvida, enquanto que 44% dos contaminantes foram retirados da solução inicial. Neste processo, obteve-se um fator de purificação da cefamicina de 1,5. Como parte da cefamicina C é adsorvida na resina, houve certa diluição do composto no caldo, obtendo-se um fator de concentração de 0,73.

Após a etapa de adsorção em XAD4, o caldo foi coletado e usado na alimentação da coluna empacotada com a resina de troca iônica Q Sepharose XL. A Figura 4.2 apresenta o resultado obtido.

Figura 4.2 - Perfil de adsorção e eluição de compostos com atividade antibacteriana e alguns contaminantes presentes no caldo de cultivo, em coluna de leito fixo com a resina Q Sepharose XL, a uma vazão de alimentação e eluição de 5,0 mL/min, 20°C, caldo pH 6,8.



Como relatado por Bustamante et al. (2008), os resultados do bioensaio mostraram que a cromatografia de troca iônica foi capaz de separar duas frações com atividade antimicrobiana, a primeira sendo eluída na solução de 0,1% NaCl (m/v), e a segunda, mais retida, na solução de 0,5% NaCl (m/v). As análises de CLAE detectaram cefamicina C apenas na primeira fração. O composto, ou conjunto de compostos com atividade antimicrobiana, que foram eluídos no segundo pico, não foram identificados mas supõe-se que possam ser intermediários da rota biossintética da cefamicina C, como a penicilina N, desacetoxicefalosporina e desacetilcefalosporina C, que são produzidos em pequenas quantidades e excretados para o meio de cultura. Estes compostos também apresentam atividade antimicrobiana e podem ser os responsáveis pelo pico detectado pelo bioensaio qualitativo (ROLLINS, JENSEN e WESTLAKE, 1991).

Objetivando encontrar melhores condições operacionais para a etapa de troca iônica, foram realizados experimentos de curva de ruptura, avaliando o efeito da vazão no desempenho da cromatografia durante as etapas de alimentação do caldo e eluição dos compostos retidos no leito da coluna.

Na Figura 4.3 podem ser vistas as curvas de ruptura para as três vazões de operação avaliadas e na Figura 4.4 são apresentados os perfis de concentração dos contaminantes, da cefamicina C e de compostos com atividade antimicrobiana durante a etapa de alimentação.

Figura 4.3 - Curvas de ruptura para a cefamicina C em coluna de leito fixo com resina QXL, em três diferentes vazões de operação.

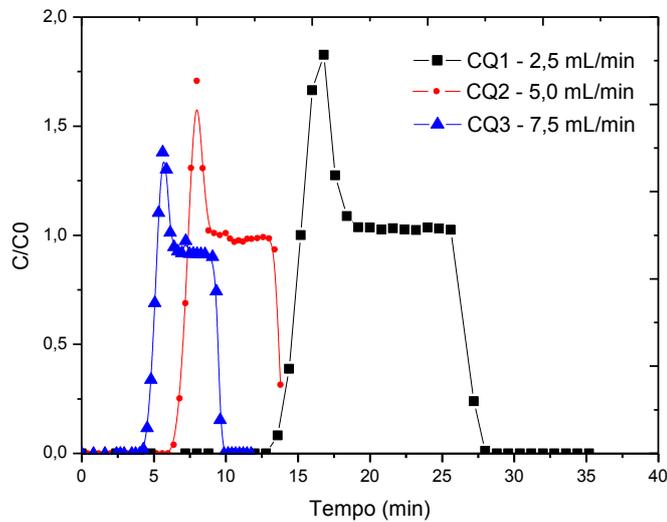
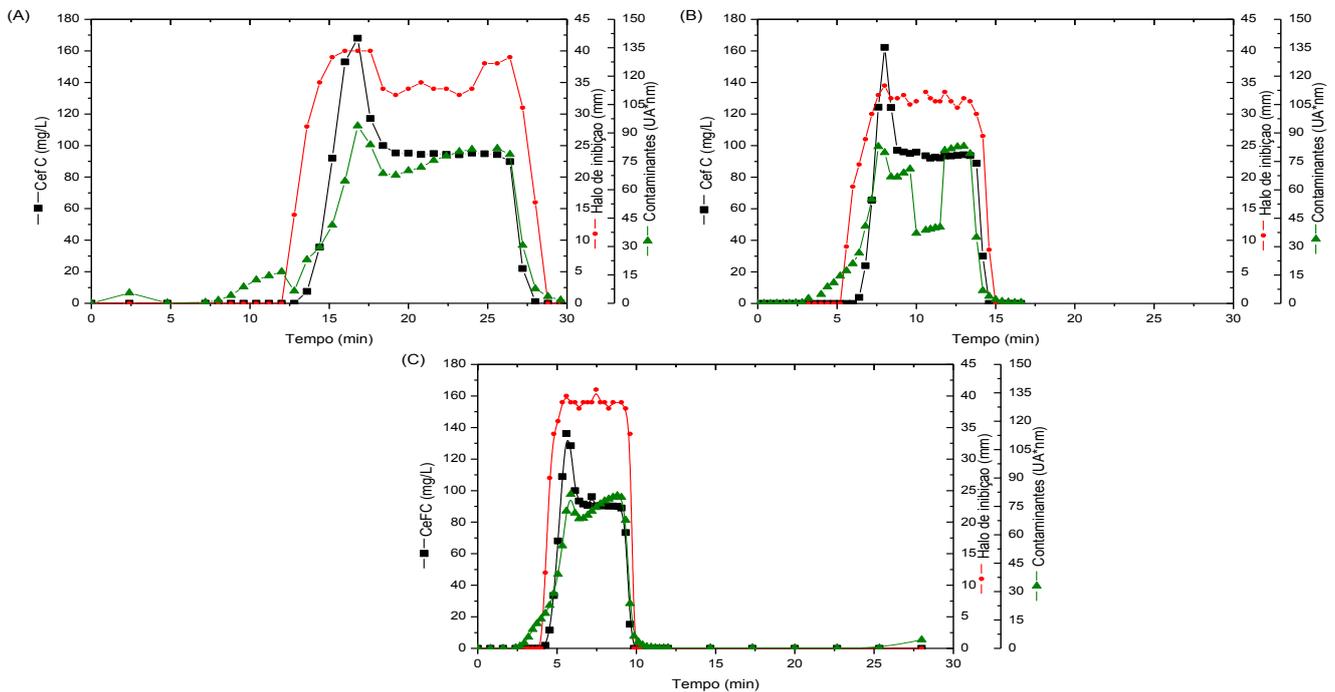


Figura 4.4 - Perfis de concentração da cefamicina C, contaminantes e compostos com atividade bactericida na saída da coluna empacotada com a resina QXL, durante a alimentação e parte da lavagem da coluna, nas vazões (A) 2,5 mL/min; (B) 5 mL/min; (C) 7,5 mL/min.



Nas três curvas, observaram-se perfis parecidos na saída da coluna. O primeiro ponto de ruptura observado foi para os contaminantes, sendo que a ruptura da cefamicina C ocorreu momentos depois. As curvas mostraram um comportamento singular da concentração de cefamicina na saída da coluna: nos instantes iniciais da alimentação, logo após a ruptura, ocorreu uma concentração da cefamicina na coluna, já que foi detectada uma concentração na

saída maior que a concentração na alimentação ($C/C_0 > 1$). Instantes depois, a concentração na saída foi diminuindo até se igualar à concentração da entrada ($C/C_0 = 1$). Este comportamento pode ser explicado por um mecanismo sequencial de troca iônica, como proposto por Barros et al. (2003) para troca iônica de metais em zeólitas. A troca iônica sequencial ocorre devido à competição entre as diferentes espécies iônicas pelos sítios ativos do adsorvente. Como consequência, quando não havia mais sítios ativos disponíveis para adsorção, os contaminantes na fase fluida foram capazes de deslocar a cefamicina já adsorvida, que foi então liberada para a fase líquida. Por isso, durante um intervalo de tempo, a concentração de cefamicina C na saída foi maior que na entrada, pois a cefamicina C desorvida juntou-se àquela já presente na alimentação. Este comportamento também explica a redução na concentração dos contaminantes após a saturação do leito. A adsorção competitiva também foi observada na separação da α -lactoalbumina e da albumina sérica bovina (WEINBRENNEF e ETZEL, 1994); durante a remoção de ácido acético e ácido butanoico de efluente de destilaria de beterraba (FARGUES, LEWANDOWSKI e LAMELOISE, 2010) e na remoção de nitrato de soluções aquosas (HEKMATZADEH et al., 2012).

As eficiências e produtividades, calculadas de acordo com as equações 3.18, 3.19 e 3.20, e outros parâmetros do processo estão apresentados na Tabela 4.1.

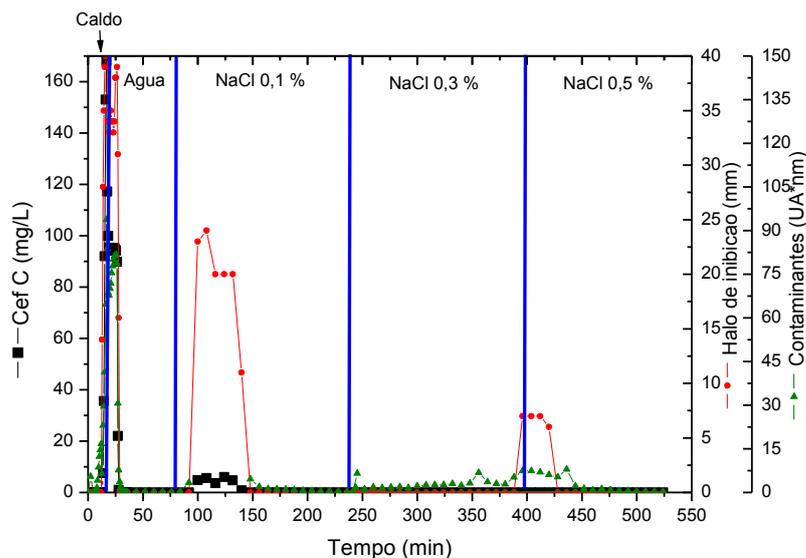
Tabela 4.1- Parâmetros calculados a partir das curvas de ruptura da cefamicina C em coluna de leito fixo, com a resina Q Sepharose XL, obtidas nos experimentos CQ1, CQ2 e CQ3.

Parâmetros	CQ1	CQ2	CQ3
t_b (min)	13,60	6,40	4,53
t_c (min)	15,20	7,40	5,28
t_t (min)	14,42	6,97	4,88
t_u (min)	13,56	6,39	4,51
q_t (mg/mL)	0,17	0,16	0,19
q_b (mg/mL)	0,16	0,15	0,18
H_t (cm)	25,60	26,00	25,60
H_b (cm)	24,07	23,92	23,60
H_{umb} (cm)	1,53	2,08	2,00
ϕ_1	0,94	0,92	0,92
ϕ_2	0,99	0,99	0,99
P (mg.min⁻¹)	0,36	0,71	1,16

Como esperado, o processo operado na maior vazão de alimentação alcançou o ponto de ruptura mais rápido, cujo t_b foi três vezes menor que o t_b obtido na menor vazão. Entre as três vazões testadas, não houve diferenças significativas nos valores de q_t , q_b e nas eficiências, indicando que a vazão não interferiu na eficiência de adsorção da cefamicina C. Foram obtidos altos valores de eficiência de recuperação do produto ($\phi_2=0,99$), sugerindo que existe uma boa afinidade entre a cefamicina C e os sítios ativos da resina. Os valores de eficiência de utilização do leito também foram altos (92-94%), mostrando que o leito foi utilizado próximo da sua capacidade máxima. A maior produtividade foi obtida no ensaio com a maior vazão.

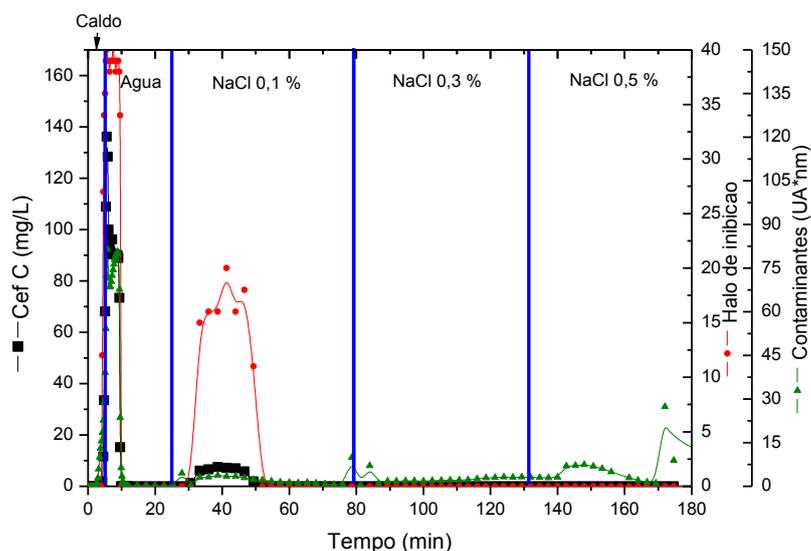
Os perfis de adsorção e eluição da cefamicina C em cada ensaio são mostrados nas Figuras 4.2 (CQ2), 4.5 (CQ1) e 4.6 (CQ3).

Figura 4.5 - Perfil de adsorção e eluição de compostos com atividade antibacteriana e alguns contaminantes presentes no caldo de cultivo, em coluna de leito fixo com a resina Q Sepharose XL, a uma vazão de alimentação e eluição de 2,5 mL/min, 20°C.



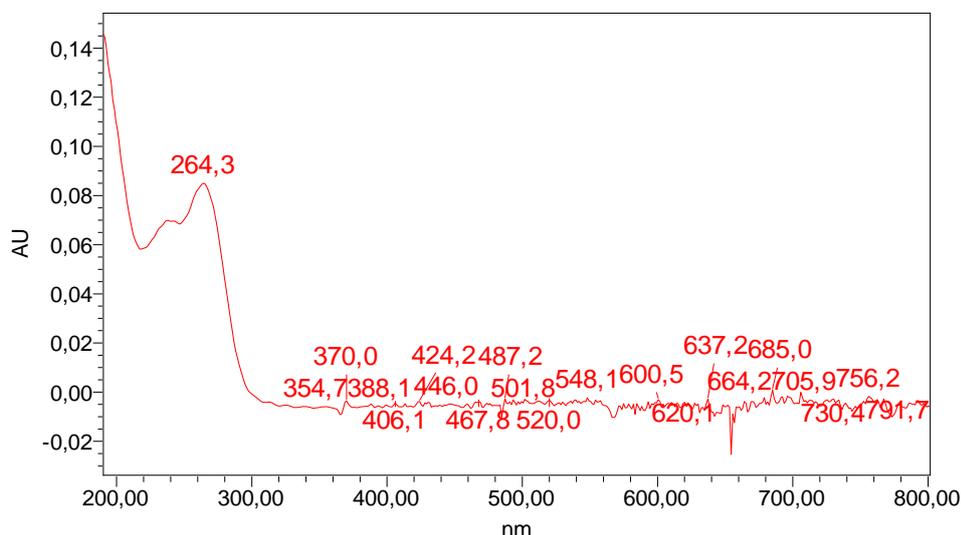
Como observado nas curvas de ruptura, os perfis obtidos foram similares, mostrando que a vazão não influenciou na dessorção da cefamicina nem dos contaminantes durante a eluição, já que os picos correspondentes a estes compostos foram detectados em todas as cromatografias, sendo eluídos na mesma concentração de eluente. A cefamicina C foi recuperada durante a eluição com a solução de NaCl 0,1%, e o segundo pico, detectado pela análise de contaminantes e/ou bioensaio, foi eluído ao passar a solução de NaCl 0,3% na coluna. E como as eficiências também não foram afetadas pela vazão, a melhor vazão para ser usada no processo é a de 7,5mL/min. Esta condição permite o uso satisfatório do leito e uma boa recuperação do produto, em um menor período de tempo.

Figura 4.6 - Perfil de adsorção e eluição de compostos com atividade antibacteriana e alguns contaminantes presentes no caldo de cultivo, em coluna de leito fixo com a resina Q Sepharose XL, a uma vazão de alimentação e eluição de 7,5 mL/min, 20°C.



A análise de contaminantes mostrou que o método de separação utilizado não foi capaz de separar os contaminantes monitorados da cefamicina C. Como pode ser visto nas Figuras 4.2, 4.5 e 4.6, alguns dos picos de contaminantes coincidem com os picos da cefamicina C detectada pelo CLAE e pelo bioensaio, e também com o segundo pico com atividade antimicrobiana. É importante salientar que a cefamicina C absorve muito pouco em comprimentos de onda acima de 300nm (Figura 4.7), o que significa que a absorção medida na análise dos contaminantes não sofreu interferência deste composto. O espectro de absorção mostrado na Figura 4.7 foi extraído da banda cromatográfica correspondente à cefamicina C após análise por CLAE.

Figura 4.7 - Espectro de absorção da banda de cefamicina C na análise por CLAE entre os comprimentos de onda de 190 a 800nm.



A eluição da fração contendo cefamicina C na solução de NaCl 0,1% promoveu uma diluição significativa do antibiótico. A concentração de sal utilizada foi muito baixa e, conseqüentemente, a força motriz que levou à troca da cefamicina C pelo íon Cl⁻ também foi baixa, levando a dessorção gradual da cefamicina C dos sítios ativos da resina. Para tentar reduzir a diluição na dessorção, foi testada a eluição com solução de NaCl 1% (CQ4), dez vezes mais concentrada. A Figura 4.8 apresenta os resultados comparativos nas duas concentrações de eluição e a Figura 4.9 apresenta os resultados obtidos durante a alimentação e eluição utilizando NaCl 1% com eluente.

Figura 4.8 - Perfis de adsorção e eluição da cefamicina C em coluna de leito fixo empacotada com a resina Q Sepharose XL, em duas concentrações diferentes de sal na eluição, à 20°C, vazão 5 mL/min. O primeiro pico representa a cefamicina C não adsorvida na alimentação, devido à saturação da coluna, já o segundo representa a cefamicina C dessorvida na eluição.

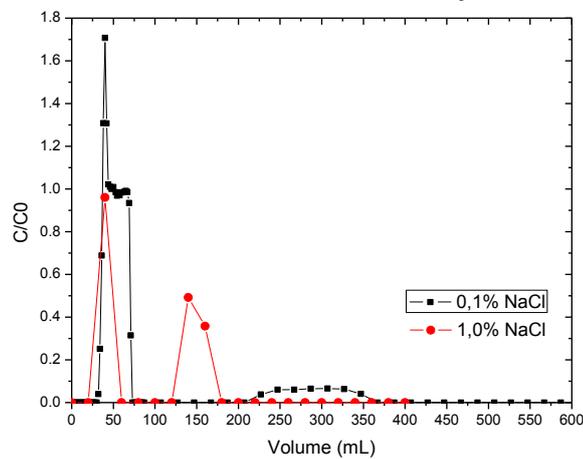
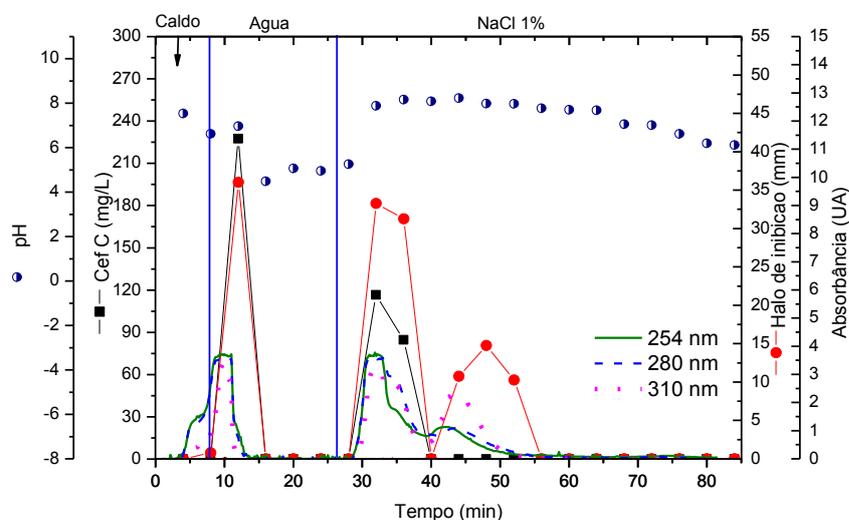


Figura 4.9 - Perfil de adsorção e eluição de compostos com atividade antibacteriana e alguns contaminantes presentes no caldo de cultivo, em coluna de leito fixo com a resina Q Sepharose XL, a uma vazão de alimentação e eluição de 5,0 mL/min, 20°C



Neste experimento, também foram feitas medidas de absorbância do efluente da coluna em três comprimentos de onda.. Observou-se que, utilizando como eluente a solução de NaCl mais concentrada, a diluição do antibiótico foi menor e foi possível obter a fração de cefamicina C em um volume menor de solução. A eluição com NaCl 0,1% promoveu a dessorção da cefamicina C em um volume total de 140 mL de solução, enquanto que eluindo com solução de NaCl 1%, a cefamicina foi eluída em um volume 40 mL. A eluição com a solução de sal de NaCl 1% também permitiu a separação de dois picos com atividade antimicrobiana, detectada pelo bioensaio, embora os picos tenham sido eluídos mais próximos.

Durante a eluição, a medida de absorbância na saída da coluna mostrou diferentes padrões de absorção entre os comprimentos de onda avaliados. No primeiro pico mostrado pelo bioensaio, esta diferença foi mais acentuada, mostrando dois picos de absorção para os comprimentos de onda de 254, 280 e 310nm. Já no segundo pico, a medida da absorção mostrou padrões similares nestes três comprimentos de onda, o que pode ser uma evidência que este segundo pico esteja mais puro que o primeiro.

A medida dos contaminantes feita nos experimentos das curvas de ruptura (Figuras 4.2, 4.5 e 4.6) estão em concordância com a medida de absorbância feita no comprimento de onda 310 nm. Nas curvas de ruptura, os picos dos contaminantes coincidem com os picos das frações com atividade antimicrobiana, e a Figura 4.9 mostrou que existe um composto (ou vários) coeluinto com a cefamicina C e que têm absorção em 310 nm, e outro composto (ou outros compostos) que são eluídos no segundo pico e que também absorvem luz no comprimento de onda de 310 nm.

A Tabela 4.2 apresenta os valores de FR obtidos em todos os ensaios de troca iônica.

Tabela 4.2 – Fatores de recuperação da cefamicina C nos processos em coluna com a resina QXL

Experimento	Vazão (mL/min)	Eluição da cefC	FR (%)			
			Total	Alimentação	Lavagem	Eluição
CQ1	2,5	NaCl 0,1%	85,8	43,4	30,8	11,5
CQ2	5	NaCl 0,1%	92,2	38,9	36,9	16,4
CQ3	7,5	NaCl 0,1%	88,3	32,3	37,9	18,2
CQ4	5	NaCl 1%	95	0	50,4	44,6

Nos experimentos CQ1 a CQ3, observou-se uma variação aleatória dos FR totais, mas durante as etapas de lavagem e eluição houve certo aumento deste valor com o aumento da vazão. Comparando-se os experimentos CQ2 e CQ4, operados a mesma vazão, os FR totais foram semelhantes, sugerindo que o aumento da concentração de NaCl na eluição não alterou a recuperação da cefamicina C.

A etapa de troca iônica permitiu a obtenção de uma fração de cefamicina C bem purificada, mas que ainda contém alguns contaminantes. Por isso, foi proposta uma nova etapa de purificação: adsorção nas resinas Amberlite XAD4 e Amberlite XAD16 em colunas de leito fixo. Estas resinas são constituídas de matriz polimérica neutra e as interações que promovem a adsorção nas mesmas são de natureza hidrofóbica. Assim, utilizando outro tipo de interação pretendeu-se separar a cefamicina C de outras classes de compostos diferentes daqueles separados nas colunas com a resina QXL, cuja interação é iônica.

Diferentemente do pré-tratamento do caldo de cultivo com a resina XAD4, realizado em reator e pH do caldo em torno de 6,6, que tinha como objetivo a adsorção dos contaminantes, a nova etapa em coluna de leito fixo teve como objetivo a adsorção da cefamicina C na resina para posterior dessorção durante a etapa de eluição. Para isso, a fração 1 (F1) da troca iônica, utilizando como eluente solução de NaCl 1%, foi liofilizada e armazenada à -80°C para uso posterior nos ensaios em coluna. Os resultados dos ensaios utilizando a F1 na alimentação estão descritos nos itens 4.4.3 e 4.5.2.

4.1.1 – Avaliação qualitativa da purificação da cefamicina C por espectrometria de massas após coluna de troca iônica em resina QXL e extração em fase sólida

A espectrometria de massas foi utilizada neste trabalho para uma avaliação qualitativa da purificação conseguida após a troca iônica na resina QXL. Antes da injeção no sistema LC-MS, as frações tiveram que passar por um procedimento para retirada do sal, já que este interfere na ionização dos compostos no espectrômetro de massas. Para isso, as frações coletadas foram aplicadas em cartucho SPE C18, onde a cefamicina C foi retida e os sais eluídos durante a lavagem com água.

A Figura 4.10 mostra as frações coletadas da coluna em resina QXL para análise posterior. Apenas as frações centrais do pico foram coletadas, já que se supôs que nesta região a pureza seria maior. A Figura 4.11 mostra os resultados de adsorção e eluição da cefamicina C no cartucho de SPE.

Figura 4.10 – Perfil de compostos com bioatividade e contaminantes em coluna de troca iônica com a resina QXL

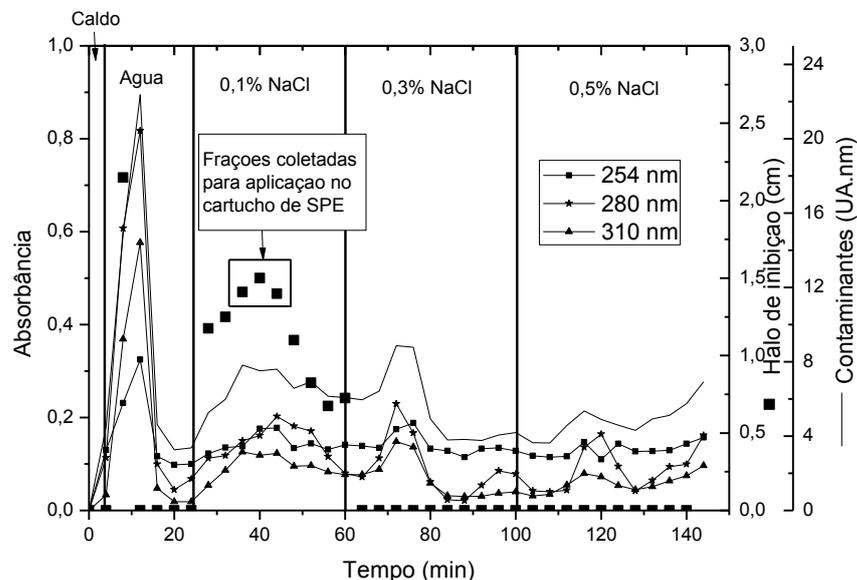
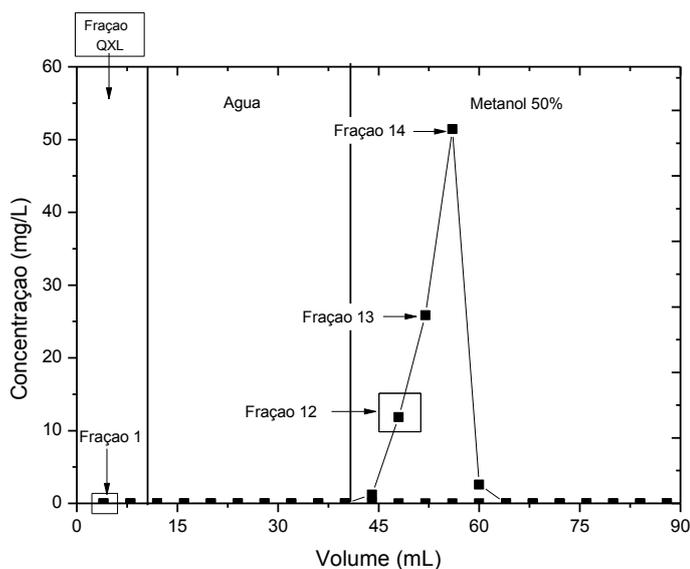


Figura 4.11- Perfil de concentração da cefamicina C durante aplicação e eluição da fração da QXL em cartucho SPE C18

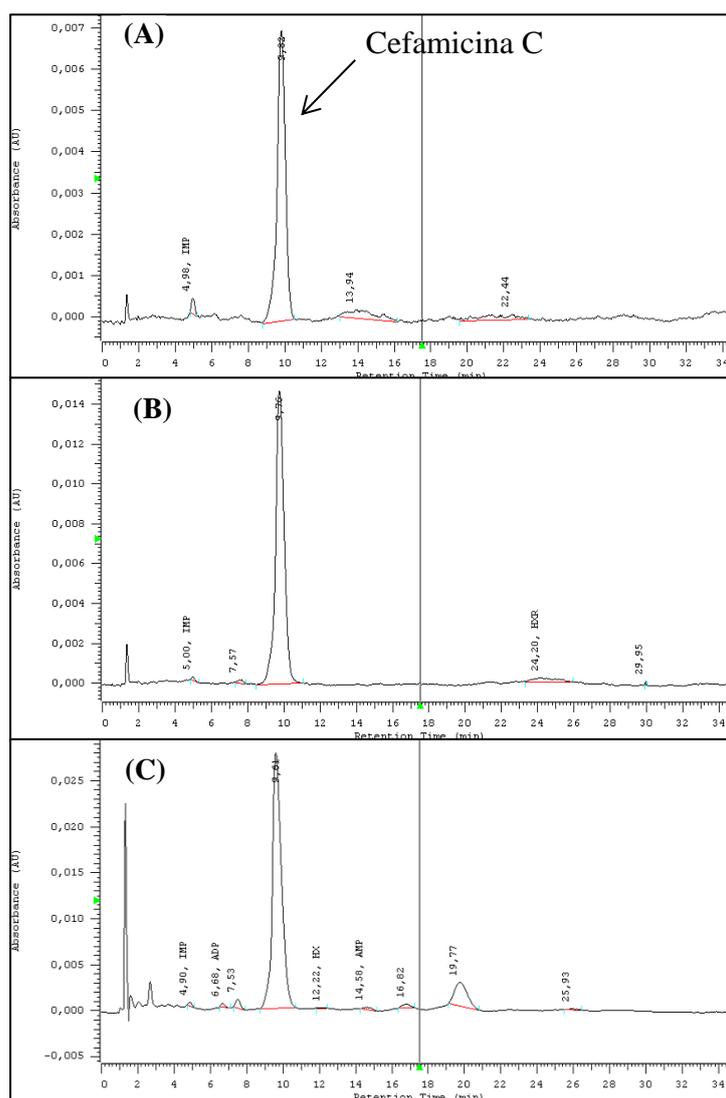


Apesar da fase estacionária C18 ter caráter não polar e a cefamicina C ser uma molécula polar, observou-se que toda cefamicina ficou retida no cartucho, sendo eluída apenas quando foi aplicada a solução de metanol 50%. A diminuição do pH da fração aplicada para 2,6 provavelmente suprimiu a ionização dos grupos carboxílicos da molécula de cefamicina C, possibilitando a adsorção do composto no adsorvente. Neste experimento, foram coletadas quatro frações contendo cefamicina C. Estas frações passaram por análise de CLAE para detecção e quantificação da cefamicina C e os cromatogramas obtidos para as três

primeiras frações são apresentados pela Figura 4.12. Desconsiderou-se a última fração porque continha muito pouca cefamicina C (2,5 mg/L).

Nos cromatogramas das frações 12 e 13 (Figura 4.12 (A) e (B)) observou-se quase que exclusivamente o pico da cefamicina C, contendo apenas outros picos bem pequenos. Este resultado sugere que estas frações continham cefamicina C em alto grau de pureza. Em contrapartida, na fração 14 (Figura 4.12 (C)) a pureza obtida foi menor, já que foram detectados mais picos além do pico da cefamicina. Os cromatogramas foram obtidos no comprimento de onda 254 nm, logo, apenas os compostos que absorvem luz neste comprimento de onda foram detectados. Uma técnica de análise mais abrangente que fosse capaz de detectar diferentes compostos presentes na amostra seria mais adequada para avaliar a purificação, e por isso optou-se pela espectrometria de massas, que é capaz de detectar todos os compostos ionizáveis em uma amostra.

Figura 4.12 – Cromatogramas obtidos a 254 nm após análise quantitativa da cefamicina C das frações coletadas durante a extração em fase sólida. (A) Fração 12; (B) Fração 13; (C) Fração 14



As análises por LC-MS foram feitas apenas para a fração 12, que se julgou ser a mais pura pela observação dos cromatogramas obtidos por CLAE. Para avaliar a purificação obtida na troca iônica seguida da extração em fase sólida, o caldo clarificado, que foi utilizado na alimentação da coluna com a resina QXL, também foi analisado.

O espectrômetro de massas foi operado no modo positivo, ou seja, ao passar pela fonte de ionização as moléculas recebiam um próton, adquirindo uma carga positiva e também mais uma unidade de massa molecular, correspondente à massa do hidrogênio. Logo, a razão m/z (massa/carga) detectada correspondia à massa molar do composto mais um. Em espectrometria de massas, quando o íon chega ao detector, há formação de uma corrente elétrica, que é medida e então transformada em uma escala de intensidade, que representa a escala das ordenadas nos cromatogramas obtidos neste tipo de análise. Foram obtidos os cromatogramas de íons totais (do inglês “Total Ion Chromatogram” TIC), que apresentam o somatório da intensidade de sinais de todos os íons que chegam ao detector em função do tempo de retenção cromatográfico, e os cromatogramas de pico base (do inglês “Base Peak Chromatogram” BPC), que mostram a intensidade dos sinais de íons que chegam ao detector, e que estão dentro de uma determinada faixa de razão m/z pré-selecionada, em função do tempo. Ou seja, no TIC todos os compostos ionizáveis presentes na amostra são detectados e apresentados no cromatograma, já no BPC apenas os sinais dos íons que estão dentro da faixa de razão m/z escolhida são mostrados no cromatograma.

Os cromatogramas de pico base são mais seletivos e foram utilizados para análise comparativa das amostras injetadas. Para isto, foram selecionados alguns contaminantes que poderiam estar presentes no caldo de cultivo da cefamicina C e determinou-se a razão m/z que adquiririam após ionização. Foram obtidos os TIC e o BPC para estes contaminantes e para a cefamicina C. Para obtenção dos BPC, selecionou-se uma faixa estreita de razão m/z correspondente a $\pm 0,5$ unidade de razão m/z de cada composto, de forma que fosse possível isolar quase que exclusivamente os íons correspondentes ao composto que se desejava monitorar. A análise qualitativa baseou-se na comparação entre a intensidade dos picos dos contaminantes e da cefamicina C nos BPC obtidos para cada composto.

Os compostos escolhidos para avaliação da purificação foram alguns intermediários da rota metabólica da cefamicina C que estão presentes no caldo de cultivo e apresentam estrutura química similar à da cefamicina (ROLLINS, JENSEN e WESTLAKE, 1991) – desacetilcefalosporina C, desacetoxicefalosporina C e penicilina N. A lisina também foi monitorada porque o meio de cultivo usado na fermentação para produção da cefamicina

continha grandes quantidades deste aminoácido. Como o espectrômetro de massas foi operado no modo positivo, a razão m/z (massa/carga) observada correspondia à massa molar do composto mais um. A Tabela 4.3 apresenta as razões m/z dos compostos monitorados.

Tabela 4.3 – Compostos monitorados nas análises por espectrometria de massas e as respectivas razões m/z

Composto	m/z
Cefamicina C	447, 4323
Desacetilcefalosporina C	374,3816
Desacetoxicefalosporina C	358,3822
Penicilina N	360,3980
Lisina	147,1876

Fonte: ChemWeb.com.

Os cromatogramas obtidos para o caldo antes da troca iônica e para a fração 12 são mostrados pelas Figuras 4.13 e 4.14, respectivamente.

Figura 4.13– Cromatogramas obtidos após injeção do caldo calrificado no sistema LC-MS: (A) ultravioleta (254nm); (B) íons totais; (C-H) pico base. Os cromatogramas de pico base correspondem às seguintes moléculas: (C) cefamicina C, (D) penicilina N, (E) desacetilcefalosporina C, (F) desacetoxicefalosporina C, (G) lisina.

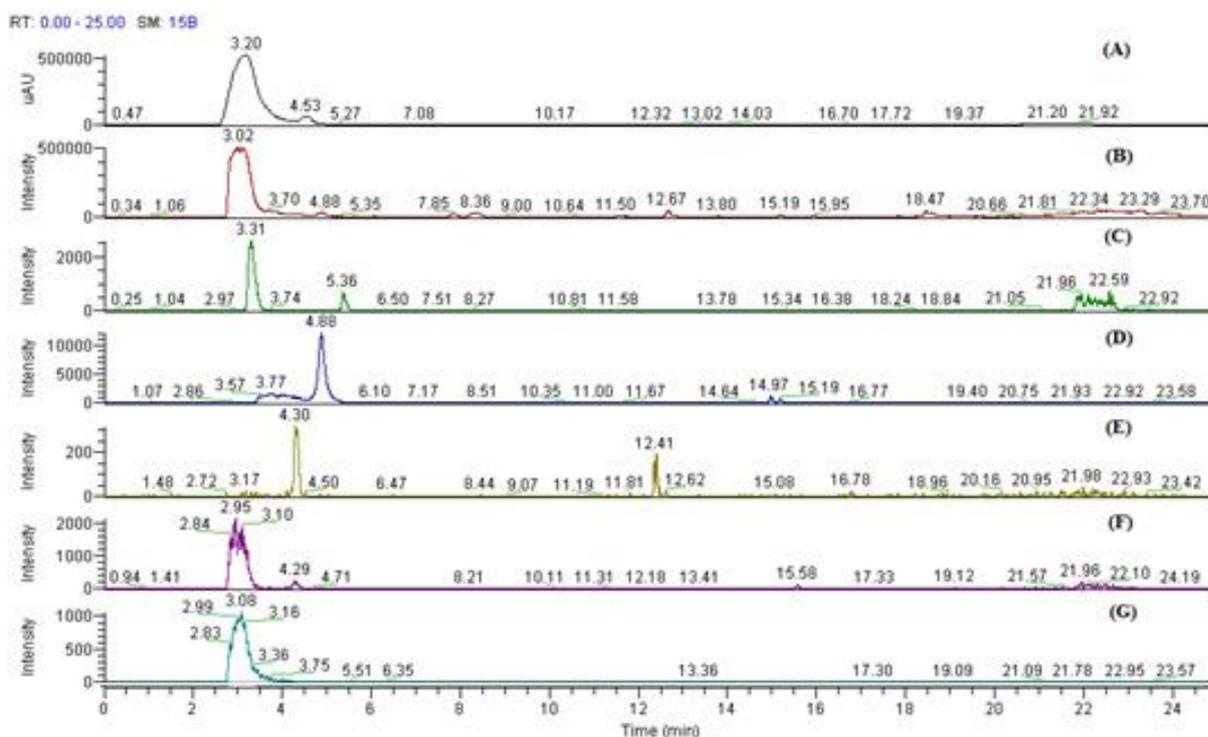
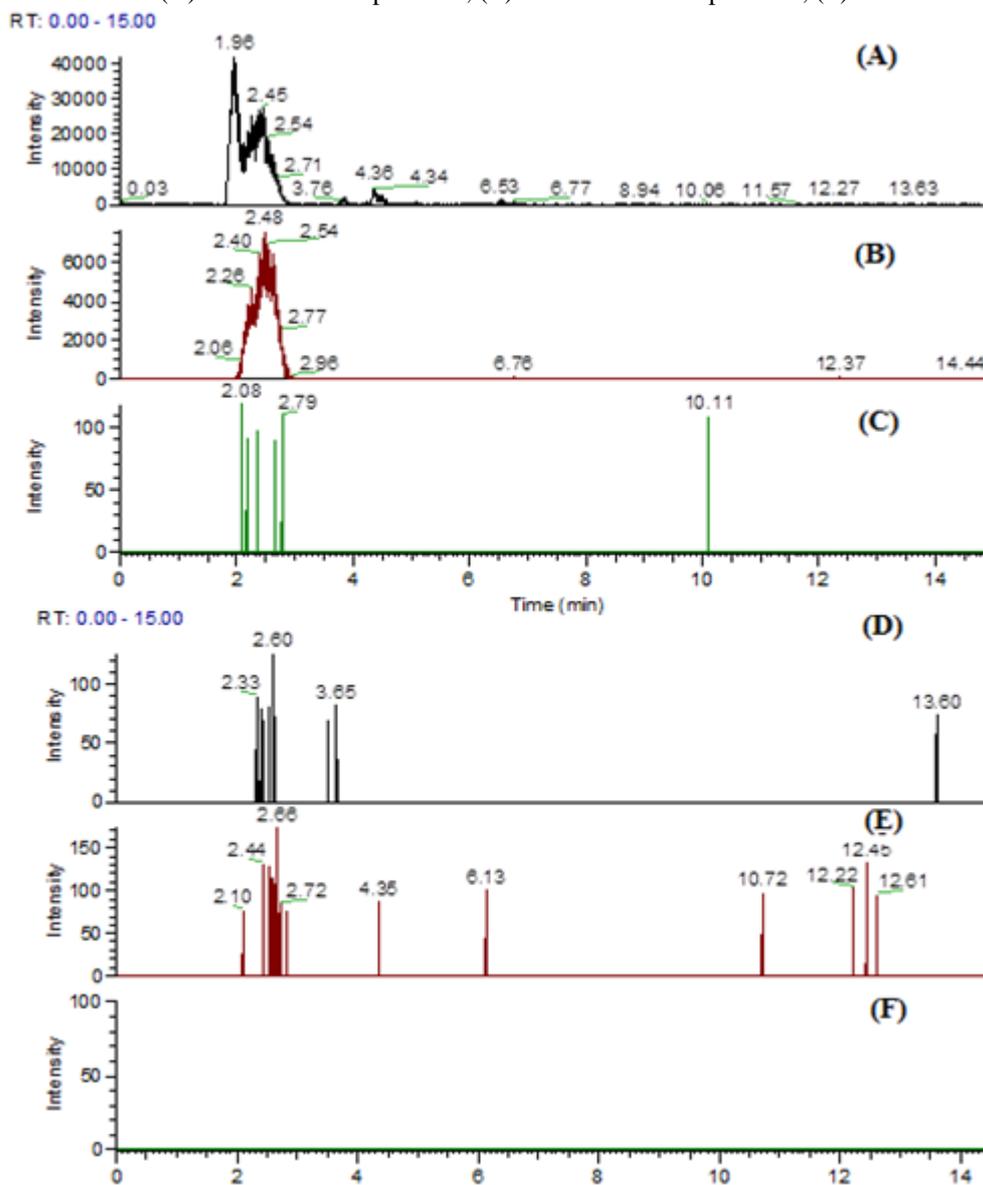


Figura 4.14– Cromatogramas obtidos após injeção da fração 12 no sistema LC-MS: (A) íons totais; (B-G) pico base. Os cromatogramas de pico base correspondem às seguintes moléculas: (B) cefamicina C, (C) penicilina N, (D) desacetilcefalosporina C, (E) desacetoxicefalosporina C, (F) lisina.



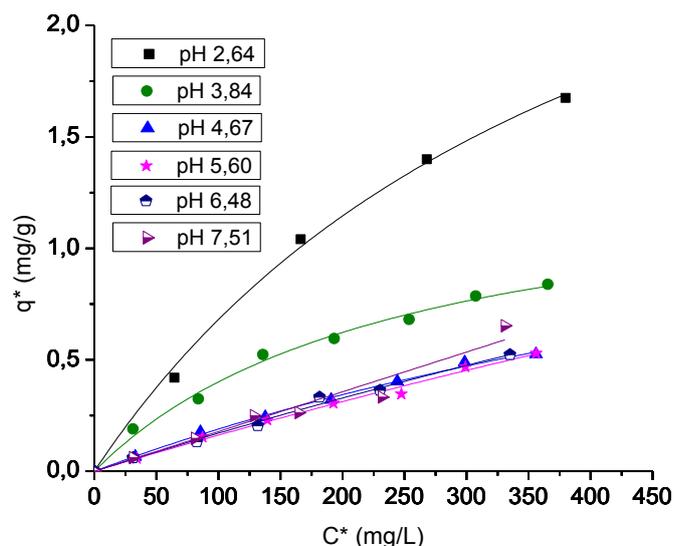
Os cromatogramas de pico base mostraram que tanto no caldo inicial quanto na fração 12 foram observados picos de razão m/z correspondentes aos compostos monitorados, exceto para a lisina, que não foi detectada na fração 12. Entretanto, observa-se que houve uma diminuição na intensidade dos picos dos contaminantes em relação ao pico da cefamicina na fração 12. A Figura 4.13 mostra que a intensidade máxima da cefamicina C medida no caldo foi em torno de 2000 e para os contaminantes majoritários penicilina N, desacetoxicefalosporina C e lisina foram em torno de 10000, 2000 e 1000, respectivamente. A desacetilcefalosporina C apresentou uma intensidade menor, em torno de 200. Os cromatogramas da fração 12 (Figura 4.14) mostraram que a cefamicina C era o composto

majoritário, apresentando uma intensidade em torno de 6000, enquanto que a maior intensidade dos contaminantes foi observada para a desacetoxicefalosporina C, em torno de 150, e nenhum sinal correspondente à lisina foi detectado. Estes resultados indicam que o processo de troca iônica seguido da extração em fase sólida promoveu uma separação parcial da cefamicina C dos contaminantes monitorados e a separação completa da lisina.

4.2- Isotermas de adsorção da Cefamicina C nas resinas aromáticas Amberlite XAD4 e Amberlite XAD16

As isotermas de adsorção da cefamicina C na resina Amberlite XAD4 à temperatura de 20°C podem ser vistas na Figura 4.15.

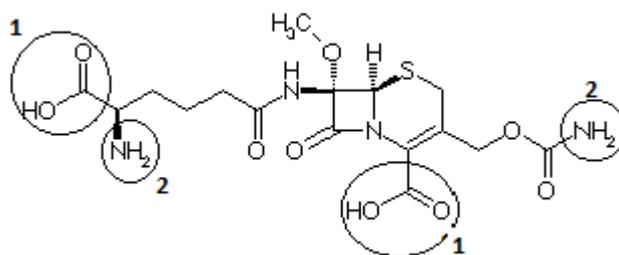
Figura 4.15 - Isotermas de adsorção da cefamicina C em XAD4 à 20°C, em diferentes valores de pH.



As isotermas apresentadas mostram claramente a dependência da adsorção com o pH do meio. No pH 2,64 observou-se a maior massa de cefamicina C adsorvida, apresentando um valor máximo experimental de $q^*=1,67$ mg/g para um valor de $C^*=379,93$ mg/L. A elevação do pH para 3,84 provocou uma diminuição pela metade no valor máximo de q^* , que passou para 0,84 mg/g para um valor de $C^*=365,63$ mg/L. Houve também uma redução na adsorção no pH 4,67 em relação ao pH 3,84, mas os aumentos posteriores no pH não provocaram mudanças significativas na adsorção, sendo que foram atingidos valores máximos experimentais de q^* em torno de 0,5 mg/g, para valores de C^* entre 330-350 mg/L.

Este comportamento se deve à natureza iônica da molécula da cefamicina, que apresenta grupos funcionais ionizáveis ligados às cadeias laterais e ao anel di-hidrotiazina (Figura 4.16). Sendo a resina XAD4 uma resina poli-aromática neutra, o tipo de interação que promove a adsorção é de caráter não-iônico, ou seja, somente estruturas sem cargas são adsorvidas em sua superfície.

Figura 4.16 - Estrutura molecular da Cefamicina C. Os grupos funcionais ionizáveis estão destacados pelos círculos. 1) Grupos carboxílicos; 2) Grupos amino



Em valores de pH baixos, os grupos carboxílicos encontram-se protonados, ou seja, o núcleo bicíclico da molécula, formado pelos anéis β -lactâmico e di-hidrotiazina, está sem carga e pode, então, ser adsorvido na superfície da resina. O aumento do pH leva à perda de prótons pelos grupos carboxílicos e a carga negativa no núcleo da molécula dificulta a adsorção da mesma na resina. A adsorção ainda ocorre em valores de pH mais altos porque nestas condições existem moléculas de cefamicina com o núcleo desprotonado, devido ao equilíbrio químico ácido-básico em que moléculas com cargas e sem cargas coexistem, mas em proporções diferentes, dependendo do pH do meio.

A mesma dependência em relação ao pH foi observada para a cefalosporina C, molécula bem semelhante à cefamicina C, e para a penicilina V (CHAUBAL et al., 1995). A adsorção desses antibióticos na resina XAD16, que possui a mesma estrutura química da XAD4, reduziu drasticamente com o aumento do pH e, segundo os autores do trabalho, esta redução também ocorreu devido à ionização das moléculas com o aumento do pH.

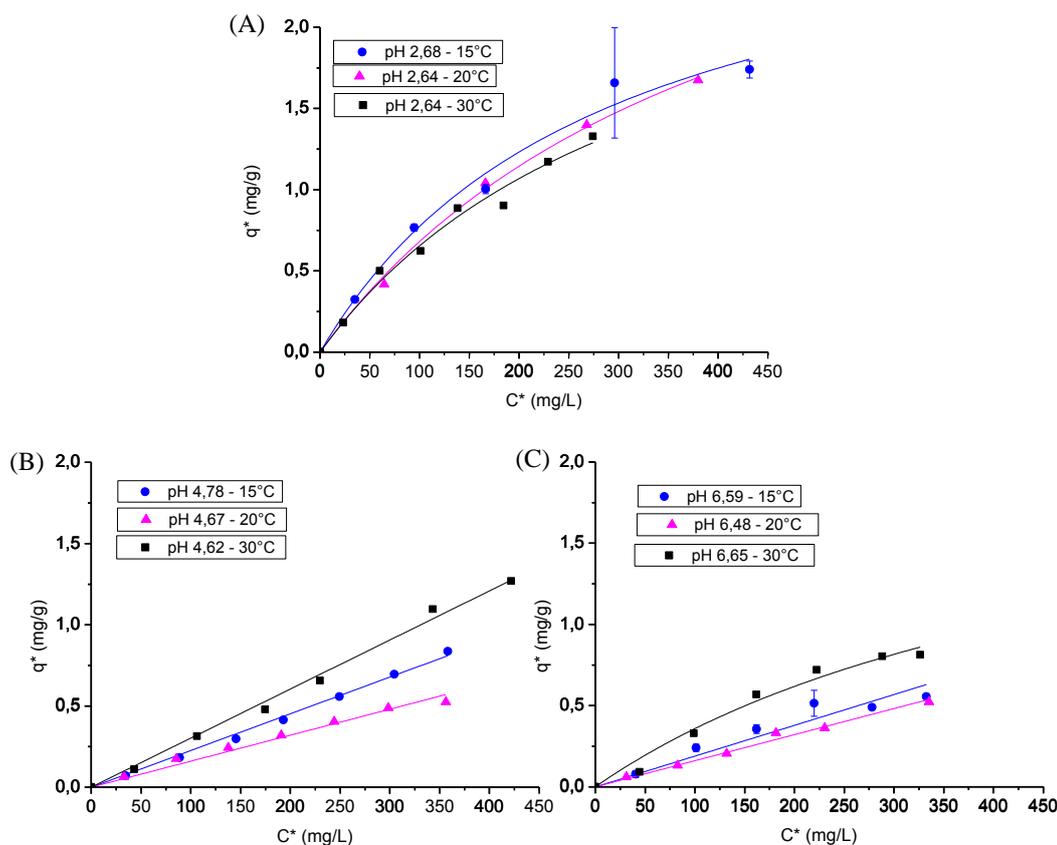
Neste mesmo estudo foi proposto um modelo de adsorção da cefalosporina C sobre a resina XAD16. Os autores representaram a resina como uma única molécula de benzeno, simulando o grupo fenil da resina, e realizaram simulações da adsorção do antibiótico sobre este anel. A configuração de menor energia mostrou considerável empilhamento do anel bicíclico da cefalosporina sobre o anel benzeno, uma forte indicação de que a adsorção ocorre pela interação da resina com o núcleo bicíclico do antibiótico. Provavelmente, a cefamicina C tem o mesmo comportamento, devido à semelhança estrutural das duas moléculas. A presença de um grupo carregado no núcleo bicíclico promoveria uma

repulsão e não uma interação com o grupo fenil da resina, o que vai de acordo com os resultados obtidos, que em valores de pH nos quais o grupo carboxílico do núcleo do antibiótico está protonado a adsorção foi maior.

Além do pH, sabe-se que a temperatura também é uma condição que influencia o equilíbrio de adsorção. Assim, foram escolhidos três valores de pH equidistantes para se estudar a adsorção da cefamicina C em três temperaturas nas resinas aromáticas XAD16 e XAD4. As isothermas obtidas foram ajustadas ao modelo de adsorção de Langmuir e/ou ao modelo linear.

A Figura 4.17 mostra as isothermas obtidas com a resina XAD4 e os ajustes aos modelos de equilíbrio de adsorção. O modelo que melhor se ajustou variou em função do pH. Os valores dos parâmetros obtidos podem ser vistos nas Tabelas 4.3 e 4.4.

Figura 4.17- Isothermas de adsorção da Cefamicina C na resina XAD4 em diferentes temperaturas. Os símbolos representam os pontos experimentais e a linha contínua o ajuste ao modelo de equilíbrio de adsorção de Langmuir ou Linear. A) pH ~2,6, ajuste ao modelo de Langmuir; B) pH ~4,6, ajuste ao modelo linear; C) pH ~6,6, ajuste ao modelo linear e de Langmuir.



Os resultados experimentais e as curvas de ajuste mostraram uma pequena redução na adsorção com o aumento da temperatura, exceto na temperatura de 30°C para as condições de pH em torno de 4,6 e 6,6. Nestes casos, as isothermas desviaram-se do

comportamento esperado, apresentando uma inclinação da curva maior que nas temperaturas de 15 e 20°C. Sendo o fenômeno de adsorção um processo exotérmico, espera-se que a adsorção diminua com o aumento da temperatura. Mas como ela também é dependente da solubilidade do adsorbato no solvente (BARTELL, THOMAS e FU, 1951), pode ser que a mudança de temperatura tenha alterado a solubilidade da cefamicina C levando ao aumento da adsorção máxima observada. Mas como não há dados de solubilidade da cefamicina em função da temperatura e não existe o padrão do composto disponível para ser adquirido, esta hipótese não pôde ser confirmada.

Para o pH em torno de 2,6, foi feito o ajuste ao modelo de Langmuir, representado pela equação 2.1.

$$q^* = \frac{q_m \times C^*}{K_D + C^*} \quad (2.1)$$

em que q^* é a massa de cefamicina C adsorvida por unidade de massa de adsorvente, no equilíbrio; C^* é a concentração de cefamicina C em solução, no equilíbrio; e q_m e K_D são os parâmetros do modelo. O q_m representa a capacidade máxima de adsorção da resina e está relacionado ao número de sítios disponíveis para adsorção. Assim, como o número de sítios de adsorção é uma característica fixa do adsorvente, o valor de q_m supostamente deve ser o mesmo para um determinado sistema adsorvente-adsorbato, em qualquer condição de temperatura ou pH. O K_D representa a razão entre as constantes de dessorção e adsorção, como demonstrado por Barboza, Hokka e Maugeri (2002). Desta forma, quanto maior o valor de K_D , maior é o valor da constante de dessorção em relação ao valor constante de adsorção. Conseqüentemente, quanto maior o valor de K_D menor é a tendência do adsorbato se manter adsorvido na resina.

Em pH 2,6, observou-se o aumento do valor de K_D com o aumento da temperatura, exceto para a temperatura de 30°C (Tabela 4.4). Neste caso, a concentração de cefamicina máxima utilizada no experimento foi menor que nas outras temperaturas, e conseqüentemente, o valor máximo experimental de q^* também foi menor. Assim, o ajuste pode ter subestimado o valor de q_m , e conseqüentemente, o valor de K_D . A Figura 4.17 (A) mostra que as inclinações das curvas de ajuste diminuem com a temperatura. Apesar dos dados experimentais não mostrarem a saturação da resina, a menor inclinação da curva sugere que esta saturação será alcançada em um valor de concentração de equilíbrio da cefamicina C na fase líquida maior, ou seja, o valor de K_D também será maior. Neste caso, o ajuste do

modelo não foi capaz de explicar a influência da temperatura na adsorção, mas os dados experimentais mostram uma coerência na adsorção.

Tabela 4.4 - Parâmetros do modelo de Langmuir ajustados para as isotermas de adsorção da cefamicina C em XAD4, em diferentes valores de pH e temperaturas.

Temperatura 15°C				Temperatura 20°C				Temperatura 30°C			
pH	q _m (mg/g)	K _D (mg/L)	R ²	pH	q _m (mg/g)	K _D (mg/L)	R ²	pH	q _m (mg/g)	K _D (mg/L)	R ²
2,68	3,01	288,6	0,98	2,64	3,61	430,25	0,99	2,64	2,91	344,02	0,98
4,78	*	*	*	4,67	1,87	888,49	0,99	4,62	*	*	*
6,59	1,28	414,36	0,97	6,48	4,37	2459,22	0,99	6,65	2,26	530,436	0,97

Nos valores de pH em torno de 4,6, o modelo de adsorção de Langmuir só se ajustou para a temperatura de 20°C. Então foi feito o ajuste ao modelo de adsorção linear (equação 2.4), que é utilizado para soluções diluídas. Baseando-se na hipótese de que somente moléculas com o núcleo bicíclico neutro são adsorvidas na resina XAD4, em pH 4,6 a concentração de moléculas com o núcleo neutro é bem pequena. Se considerarmos o pKa da cefalosporina (2,8) (CHAUBAL et al., 1995), somente 1,5% das moléculas estão com o grupo carboxílico protonados. Assim, é válido a utilização do modelo linear neste pH.

$$q^* = KC^* \quad (2.4)$$

em que q* é a massa de cefamicina C adsorvida por unidade de massa de adsorvente, no equilíbrio; K é a constante do modelo e C* é a concentração de cefamicina C no equilíbrio.

Nas condições de pH em torno de 6,6 também foram feitos ajustes ao modelo linear para as isotermas nas temperaturas de 15 e 20°C. A 30°C, a isoterma não apresentou comportamento linear. Os valores das constantes obtidos são mostrados na Tabela 4.5.

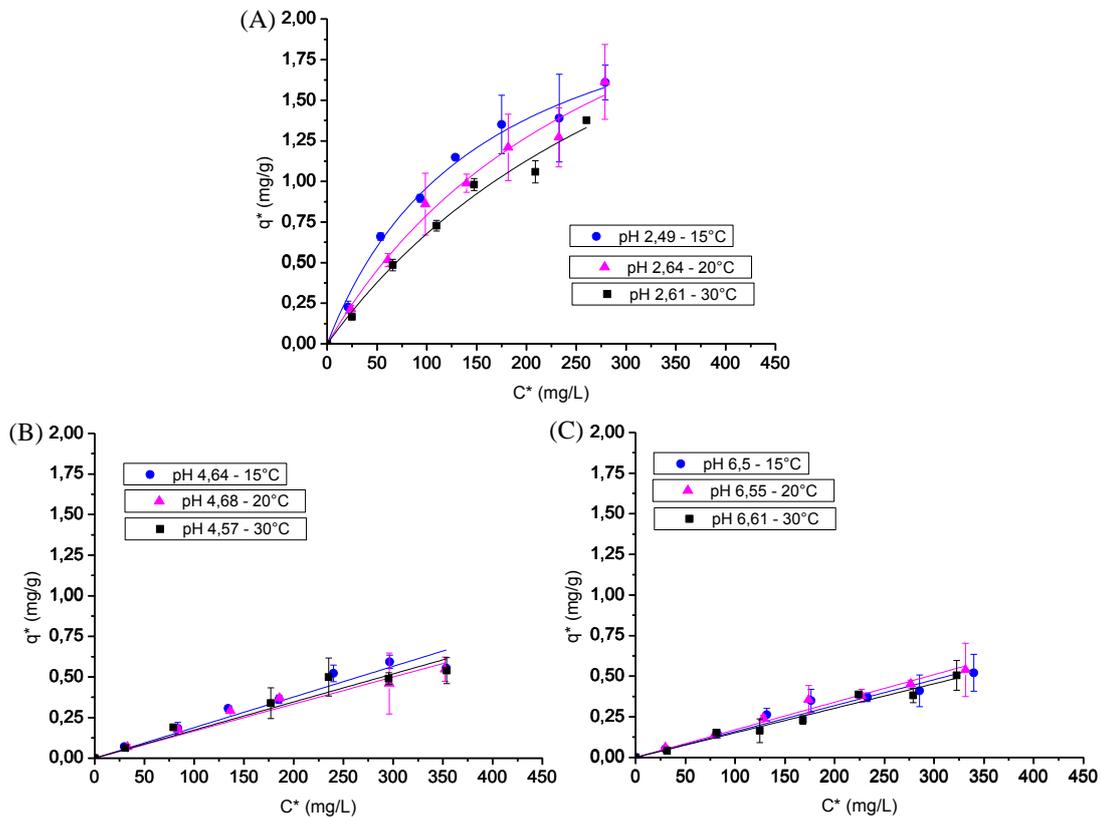
Tabela 4.5 - Parâmetros do modelo linear ajustados para as isotermas de adsorção da cefamicina C em XAD4, em diferentes valores de pH e temperaturas.

Temperatura 15°C			Temperatura 20°C			Temperatura 30°C		
pH	K x 10 ³ (L/g)	R ²	pH	K x 10 ³ (L/g)	R ²	pH	K x 10 ³ (L/g)	R ²
2,68	*	*	2,64	*	*	2,64	*	*
4,78	2,26	0,99	4,67	1,6	0,99	4,62	3,02	0,99
6,59	1,89	0,98	6,48	1,61	0,99	6,65	*	*

As constantes do modelo linear sofreram uma redução com o aumento da temperatura de 15 para 20°C, tanto para as condições de pH~4,6 quanto para pH~6,6, sendo que no primeiro esta diferença foi mais acentuada. É possível dizer que o modelo linear é o mais adequado para descrever o equilíbrio de adsorção da cefamicina C nas condições de pH em torno de 4,6 e 6,6, já que os gráficos de isotermas mostraram que foram obtidas retas nestas condições, exceto à 30°C, pH 6,6.

As isotermas obtidas para a resina XAD16 e os ajustes aos modelos de equilíbrio de adsorção são mostrados na Figura 4.18.

Figura 4.18 Isotermas de adsorção da Cefamicina C na resina XAD16 em diferentes temperaturas. Os símbolos representam os pontos experimentais e a linha contínua o ajuste ao modelo de equilíbrio de adsorção de Langmuir ou linear. A) pH ~2,6, ajuste ao modelo de Langmuir; B) pH ~4,6, ajuste ao modelo linear; C) pH~6,6, ajuste ao modelo de linear.



Ao contrário das isotermas obtidas para a resina XAD4, para a resina XAD16 foi possível ajustar o modelo de Langmuir para todos os valores de pH e temperatura avaliados. Também foi feito o ajuste ao modelo linear para as isotermas realizadas em condições de pH~ 4,6 e 6,6. Os parâmetros dos modelos de Langmuir e linear são apresentados nas Tabelas 4.6 e 4.7, respectivamente.

Tabela 4.6 - Parâmetros do modelo de Langmuir ajustados para as isotermas de adsorção da cefamicina C em XAD16, em diferentes valores de pH e temperaturas.

Temperatura 15°C				Temperatura 20°C				Temperatura 30°C			
pH	q _m (mg/g)	K _D (mg/L)	R ²	pH	q _m (mg/g)	K _D (mg/L)	R ²	pH	q _m (mg/g)	K _D (mg/L)	R ²
2,49	2,46	156,09	0,99	2,49	3,20	303,70	0,99	2,61	3,34	391,69	0,99
4,64	1,53	534,81	0,97	4,68	1,27	479,29	0,99	4,57	1,20	411,32	0,98
6,5	1,60	710,71	0,99	6,55	2,05	944,99	0,99	6,61	1,82	1068,89	0,99

Tabela 4.7 - Parâmetros do modelo linear ajustados para as isotermas de adsorção da cefamicina C em XAD16, em diferentes valores de pH e temperaturas.

Temperatura 15°C			Temperatura 20°C			Temperatura 30°C		
pH	K x 10 ³ (L/g)	R ²	pH	K x 10 ³ (L/g)	R ²	pH	K x 10 ³ (L/g)	R ²
2,49	*	*	2,49	*	*	2,61	*	*
4,64	1,89	0,98	4,68	1,67	0,98	4,57	1,73	0,98
6,6	1,60	0,99	6,55	1,70	0,99	6,61	1,39	0,99

Em pH em torno de 2,6, as isotermas apresentaram o comportamento esperado – diminuição da adsorção máxima atingida com o aumento da temperatura (Figura 4.18 (A)). Os parâmetros do modelo de Langmuir obtidos confirmam esta tendência, já que os valores de K_D aumentaram com a temperatura. Sendo a adsorção um processo exotérmico (BARTELL, THOMAS e FU, 1951), o aumento da temperatura desfavorece a adsorção. E como K_D representa a razão entre as constantes cinéticas de dessorção e adsorção, esperava-se um aumento do K_D com a temperatura.

Nos valores de pH em torno de 4,6 e 6,6 (Figura 4.18 (B) e (C)), a adsorção mostrou-se semelhante nas diferentes temperaturas testadas. Apesar disso, o ajuste ao modelo de Langmuir das isotermas nestes valores de pH forneceu valores de parâmetros diferentes. Para condições de pH próximos de 6,6, os valores de K_D aumentaram com a temperatura, já para condições de pH próximos de 4,6, houve uma redução do K_D. Mas observando os gráficos nestes valores de pH, é possível notar que a relação é claramente linear. Assim, o modelo linear seria uma melhor representação dos resultados experimentais. As constantes do modelo linear também não seguiram uma tendência linear de aumento ou redução com a mudança da temperatura, mas a variação entre os valores das constantes foi pequena. Fazendo-se a média das constantes, para o pH 4,6 o K médio seria 1,76*10⁻³(L/g), com desvio

padrão de 0,11, e para o pH 6,6 a média seria $1,56 \cdot 10^{-3}$ (L/g) e desvio padrão de 0,16, ou seja, os desvios são iguais ou menores a 10% do valor médio. Assim, considerou-se que os valores de K foram praticamente iguais. Desta forma, é possível dizer que a adsorção não sofre influência com a temperatura para as condições de pH próximas a 4,6 e 6,6. O efeito da temperatura foi mais sentido em pH em torno de 2,6, quando se tem grande parte da cefamicina C com o núcleo bicíclico na forma neutra.

Ramos, Otero e Rodrigues (2004), estudando a adsorção da cefalosporina C na resina XAD16, obtiveram os seguintes valores para os parâmetros do modelo de Langmuir, à 21°C: $q_m = 253$ mg/g e $K_D = 480$ mg/L. Dados de equilíbrio de adsorção deste mesmo antibiótico na resina XAD4, à 25°C, obtidos por Saikia (2008), apresentaram valores de $q_m = 9701,30$ (mg/g) e de $K_D = 545,17$ (mg/L). Os valores de K_D da literatura estão na mesma ordem de grandeza que os obtidos neste trabalho, mas o q_m é cerca de 100 a 10000 vezes maior, ou seja, a capacidade de adsorção da cefalosporina C nestas resinas é bem maior que a de cefamicina C. Esta diferença pode ser devido aos grupos iônicos das moléculas. Como discutido anteriormente, os grupos iônicos afetam drasticamente a adsorção, devido à natureza hidrofóbica da interação resina-adsorbato. Um grupo carregado causaria uma repulsão entre a molécula de adsorbato e o grupo aromático da resina. A cefamicina C apresenta um grupo iônico (grupo amino) a mais que a cefalosporina C, e esta carga a mais poderia ser a causa da menor adsorção da cefamicina nas resinas poliaromáticas neutras. Além disto, os estudos da literatura citados foram realizados com soluções aquosas de cefalosporina C pura, enquanto que este estudo foi feito com caldo de cultivo, que continha, além da cefamicina C, muitos contaminantes que possivelmente concorreram pelo sítio de adsorção da resina. Essa competição provavelmente reduziu a adsorção da cefamicina.

Comparando com outra resina, as capacidades de adsorção da XAD4 e XAD16 foram maiores que a obtida por Rodriguez (2011), que encontrou valores de q_m em torno de 0,15 a 0,54 (mg/g) no equilíbrio de troca iônica da cefamicina C na resina QXL e valores de K_D entre 3,6 e 76,1 (mg/L).

Alguns autores caracterizaram o equilíbrio de adsorção de alguns antibióticos em termos da afinidade, ou a inclinação da isoterma de adsorção na sua porção linear, denominada neste trabalho de q'/C^* (CHAUBAL et al., 1995; DUTTA et al., 1999; SAIKIA e DUTTA, 2006). Para fins de comparação com outros antibióticos, foram feitos os mesmos cálculos de afinidade para a cefamicina C. O valor de q^* foi recalculado para a unidade de mmolCefC/m²resina para melhor comparação entre as resinas, sendo que nesta nova unidade foi denominado de q' . As áreas superficiais da XAD4 e XAD16 são, respectivamente, 750

m^2/g e $800 m^2/g$. A Figura 4.19 mostra a afinidade (q'/C^*) em função do pH e da temperatura, e a Tabela 4.8 os valores calculados para as duas resinas.

Figura 4.19 - Afinidade de adsorção da cefamicina C nas resinas XAD4 (A) e XAD16 (B).

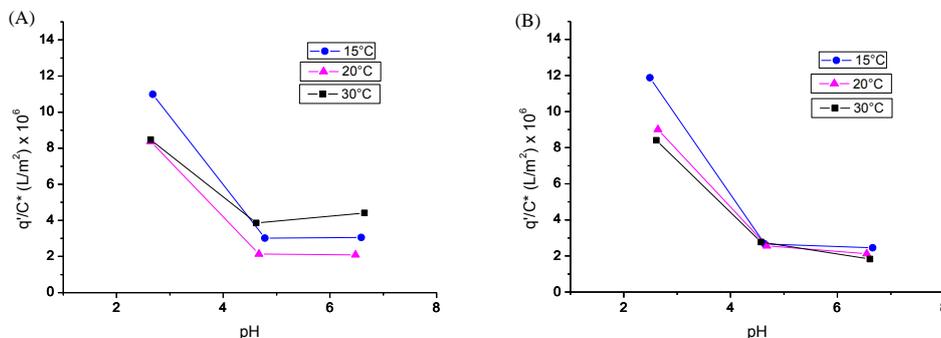


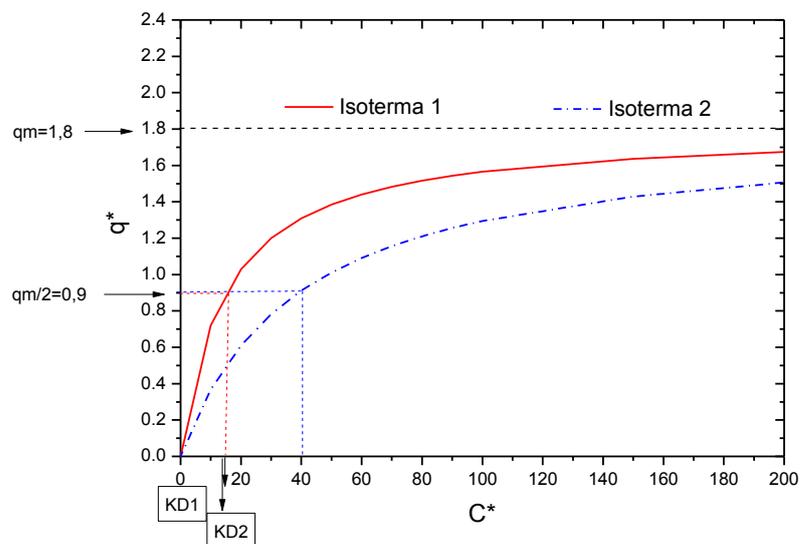
Tabela 4.8 - Valores de afinidade de adsorção para a cefamicina C em diferentes valores de pH e temperatura

XAD4								
Temperatura 15°C			Temperatura 20°C			Temperatura 30°C		
pH	q'/C^* ($\times 10^6$) (L/m ²)	R^2	pH	q'/C^* ($\times 10^6$) (L/m ²)	R^2	pH	q'/C^* ($\times 10^6$) (L/m ²)	R^2
2,68	10,99	0,99	2,64	8,37	0,99	2,64	8,47	0,99
4,78	3,01	0,99	4,67	2,13	0,99	4,62	3,85	0,98
6,59	3,05	0,99	6,48	2,09	0,99	6,65	4,41	0,99
XAD16								
Temperatura 15°C			Temperatura 20°C			Temperatura 30°C		
pH	q'/C^* ($\times 10^6$) (L/m ²)	R^2	pH	q'/C^* ($\times 10^6$) (L/m ²)	R^2	pH	q'/C^* ($\times 10^6$) (L/m ²)	R^2
2,49	11,875	0,98	2,64	9,0125	0,98	2,61	8,4125	0,99
4,64	2,6625	0,99	4,68	2,5625	0,99	4,57	2,775	0,99
6,66	2,45	0,99	6,55	2,125	0,99	6,61	1,825	0,99

O aumento da temperatura de 15 para 20°C causou uma redução da afinidade para a resina XAD4. Para a XAD16, a temperatura reduziu a afinidade somente nas condições de pH em torno de 2,6, sendo que nos outros dois valores de pH a afinidade permaneceu praticamente constante. Comparando com valores encontrados para outros antibióticos na resina XAD16, a afinidade da cefamicina C é significativamente menor: em pH em torno de

2,6, foram relatados na literatura valores de q^*/C^* (L/m^2) de, aproximadamente, 60×10^{-4} para a penicilina V e 7×10^{-4} para a cefalosporina C, a $25^\circ C$ (CHAUBAL et al., 1995). A redução da afinidade parece estar relacionada à presença de grupos iônicos na molécula. A penicilina V possui apenas um grupo carboxílico ligado ao anel tiazolidino, que em baixos valores de pH está protonado. Assim, nesta condição de pH, a molécula está totalmente sem cargas. A cefalosporina C possui um grupo carboxílico ligado ao anel di-hidrotiazina e um grupo zwitteriônico na cadeia lateral aminoacil. Em baixas condições de pH, o grupo carboxílico ligado ao anel di-hidrotiazina está sem carga, e a cadeia lateral pode estar na condição neutra – o grupo amino protonado, com carga positiva, e o grupo carboxílico desprotonado, com carga negativa (CHAUBAL et al., 1995). Assim, a molécula está neutra, mas as cargas na cadeia lateral possivelmente afetam a adsorção na resina. A cefamicina C, além de possuir os grupos ionizáveis da cefalosporina, possui mais um grupo amino na cadeia lateral ligada ao anel di-hidrotiazina (Figura 4.16), que na cefalosporina C é um grupo neutro metila (Figura 2.2). Em valores de pH baixos, este grupo está carregado positivamente, e a carga global positiva na molécula provavelmente também causa uma redução na afinidade pela resina.

A incoerência de alguns parâmetros obtidos pode ser explicada por uma possível correlação entre parâmetros nos ajustes realizados – o aumento do K_D concomitante ao aumento do q_m . Isto ocorreu em vários ajustes, tanto para a resina XAD4 como para a XAD16. Devido às limitações de concentração do caldo de cultivo utilizado, as isotermas foram realizadas em concentrações baixas de cefamicina C, assim, a saturação da resina não foi atingida. No momento do ajuste, é feita uma estimativa do valor de q_m , que pode ou não corresponder ao valor real. Com o objetivo de minimizar este efeito, foi proposto neste trabalho o cálculo do valor de q_m/K_D . Para explicar melhor o significado deste cálculo, construíram-se duas isotermas hipotéticas (Figura 4.20), representando um mesmo sistema adsorbato-adsorvente em duas condições diferentes de adsorção. Os valores de q_m são os mesmos, mas os valores de K_D são diferentes. Da isoterma de Langmuir, quando $q^* = q_m/2$, $K_D = C^*$. Assim, temos que o K_D da isoterma 1 é menor que o K_D da isoterma 2 e, conseqüentemente, a razão q_m/K_D da primeira é maior que para a segunda. Nesta abordagem, um alto valor de q_m/K_D significa que a saturação máxima da resina (q_m) é atingida em concentrações de equilíbrio (C^*) menores do soluto do que um baixo valor de q_m/K_D . Ou então, para um mesmo valor de q^* , o valor de C^* é menor para a isoterma com maior valor de q_m/K_D .

Figura 4.20 – Representação de duas isotermas hipotéticas com o mesmo q_m mas valores de K_D diferentes

Como nas condições de pH em torno de 4,6 e 6,6 o modelo que melhor representou os resultados experimentais foi o linear, esta abordagem de q_m/K_D só foi feita para as condições de pH próximas a 2,6, condição na qual o modelo de Langmuir foi adequado. O valor de q_m foi recalculado para a unidade de $\text{mgCefC}/\text{m}^2\text{resina}$ para melhor comparação entre as resinas. A Tabela 4.9 apresenta os valores calculados.

Tabela 4.9: Valores de q_m/K_D calculados para as resinas XAD4 e XAD16, nas condições de pH próximas a 2,6

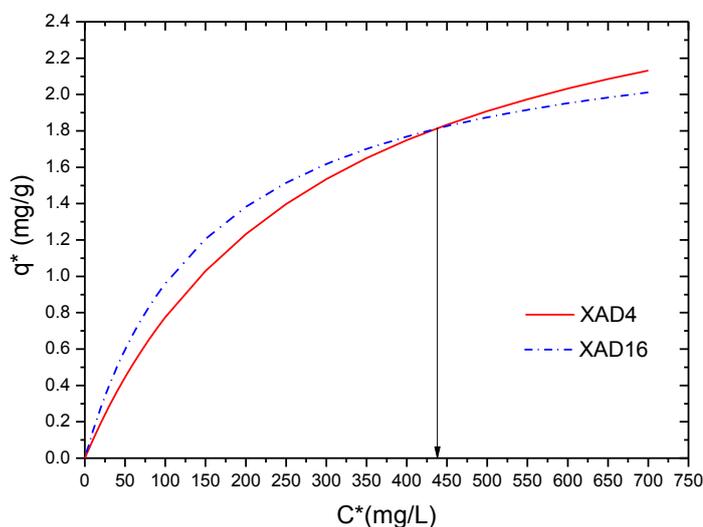
XAD4					
Temperatura 15°C		Temperatura 20°C		Temperatura 30°C	
pH	$q_m/K_D \times 10^6 \text{ (L/m}^2\text{)}$	pH	$q_m/K_D \times 10^6 \text{ (L/m}^2\text{)}$	pH	$q_m/K_D \times 10^6 \text{ (L/m}^2\text{)}$
2,68	13,91	2,64	11,19	2,64	11,28
XAD16					
Temperatura 15°C		Temperatura 20°C		Temperatura 30°C	
pH	$q_m/K_D \times 10^6 \text{ (L/m}^2\text{)}$	pH	$q_m/K_D \times 10^6 \text{ (L/m}^2\text{)}$	pH	$q_m/K_D \times 10^6 \text{ (L/m}^2\text{)}$
2,49	19,70	2,49	13,17	2,61	10,66

O aumento da temperatura mostrou uma redução no valor de q_m/K_D para as condições de pH próximas a 2,6, o que indica que há uma redução na capacidade de adsorção para o mesmo valor de concentração de equilíbrio com o aumento da temperatura. Nas condições de pH próximas a 2,6, o ajuste do modelo de Langmuir retornou valores de q_m ligeiramente maiores para a resina XAD4, mas também os valores de K_D foram maiores.

Entretanto, o valor de q_m/K_D sugere que a saturação da resina XAD16 é atingida em uma concentração de equilíbrio de cefamicina C menor que na XAD4.

A Figura 4.21 apresenta os gráficos de isotermas obtidos a partir de simulações utilizando o modelo de Langmuir e os parâmetros de q_m e K_D ajustados para as duas resinas na temperatura de 15°C. Os gráficos mostraram que até uma concentração de equilíbrio entre 425 e 450 mg/L de cefamicina C, a XAD16 tem uma capacidade de adsorção um pouco maior que a XAD4 e essa diferença vai caindo com o aumento da concentração de equilíbrio. Ressalta-se aqui que esta concentração de equilíbrio está dentro da faixa de concentrações utilizada neste estudo.

Figura 4.21 – Simulações de isotermas para as resinas XAD4 e XAD16 utilizando o modelo de Langmuir e os parâmetros q_m e K_D obtidos após ajuste dos dados experimentais à 15°C.

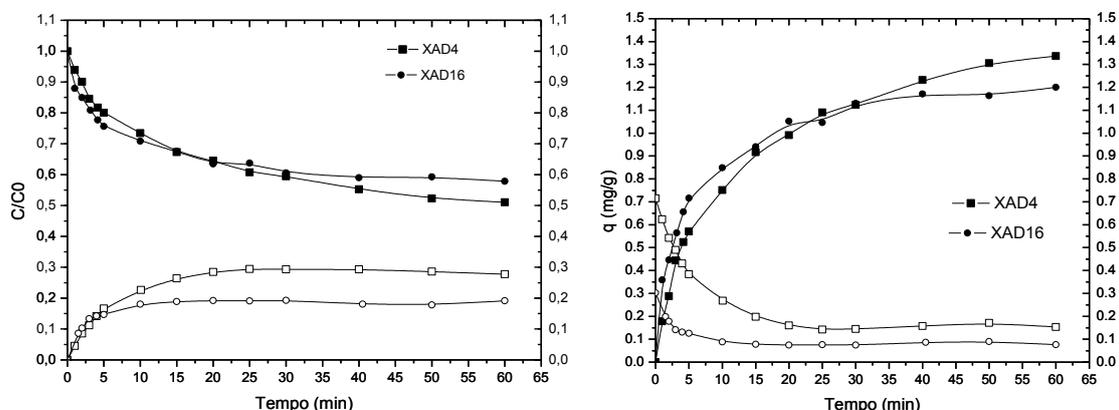


A análise dos dados experimentais e dos parâmetros calculados mostra que as melhores condições de adsorção da cefamicina C, dentro da faixa de temperatura e valores de pH avaliados neste estudo, são temperatura de 15°C e em condições de pH próximas à 2,6. A resina XAD16 apresentou capacidades de adsorção e afinidades pela cefamicina C ligeiramente maiores que a resina XAD4.

4.3 - Cinéticas de adsorção e dessorção da cefamicina C nas resinas XAD4 e XAD16

Os perfis de concentração da cefamicina C nas fases líquida e sólida nos ensaios de adsorção e dessorção em reator de mistura podem ser vistos na Figura 4.22.

Figura 4.22 - Cinética de adsorção e dessorção da cefamicina C em reator de mistura nas resinas XAD4 e XAD16. Temperatura 20°C, dessorção EtOH 15%. C e C₀ são as concentrações de cefamicina C na saída da coluna e na alimentação, respectivamente. Os símbolos fechados representam a etapa de adsorção e os símbolos abertos a etapa de dessorção.



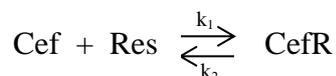
Observando-se a Figura 4.22, é possível notar que o equilíbrio é atingido um pouco mais rápido na resina XAD16 – em torno de 30 min na adsorção e 15 min na dessorção. Já para a resina XAD4, o equilíbrio é atingido em torno de 50 min na adsorção e em 20 min na dessorção.

Para obter parâmetros quantitativos que diferenciasses a cinética entre as duas resinas, os dados experimentais foram ajustados a dois modelos cinéticos diferentes: um modelo cinético simples reversível de primeira ordem, considerando que a cinética depende apenas da concentração de cefamicina C livre na fase líquida, e um modelo mais rebuscado, considerando os efeitos da resistência à transferência de massa e a cinética intrínseca de adsorção.

4.3.1 - Modelo cinético de primeira ordem

O modelo utilizado foi o mesmo proposto por Barboza, Almeida e Hokka (2002). Este modelo considera que quando ocorre o contato entre as fases líquida e sólida, a adsorção na superfície externa da resina é instantânea e que a etapa de difusão não é limitante.

A adsorção pode ser representada como um simples mecanismo de reação química reversível, como mostrado a seguir:



em que Cef representa a molécula de cefamicina C livre, Res o sítio ativo da resina disponível para adsorção, CefR o complexo da cefamicina C adsorvida no sítio ativo e k_1 e k_2 são as constantes cinéticas de adsorção e dessorção, respectivamente.

Representando Cef por A e CefR por B, o modelo cinético é descrito por:

$$\frac{dC_A}{dt} = -k_1 * C_A + k_2 * C_B \quad (4.1)$$

A concentração C_B pode ser expressa em termos de C_A por $C_B = C_{A0} - C_A$, sendo C_{A0} a concentração inicial de cefamicina C. Substituindo na equação 4.1, obtém-se a equação 4.2.

$$\frac{dC_A}{dt} = -k_1 * K_E * C_A + k_2 * (C_{A0} - C_A) \quad (4.2)$$

em que K_E é a constante de equilíbrio.

No equilíbrio, $dC_A/dt=0$, então a equação 4.2 se reduz à equação 4.3.

$$K_E = \frac{C_{A0} - C_A^*}{C_A^*} \quad (4.3)$$

Isolando-se C_{A0} , chega-se à seguinte relação:

$$C_{A0} = C_A^*(1 + K_E) \quad (4.4)$$

Substituindo a equação 4.4 na equação 4.2:

$$\frac{dC_A}{dt} = -K_R(C_A - C_A^*) \quad (4.5)$$

sendo

$$K_R = k_2(K_E + 1) \quad (4.6)$$

Após integração da equação 4.5, chega-se à equação 4.7:

$$\ln \frac{C_A - C_A^*}{C_{A0} - C_A^*} = -K_R * t \quad (4.7)$$

A partir da equação 4.7, o valor de K_R foi determinado por regressão linear dos dados experimentais. K_E foi estimado de acordo com a equação 4.3 e o valor de k_2 pode ser determinado pela equação 4.6. Sabendo-se que:

$$K_E = \frac{k_1}{k_2} \quad (4.8)$$

o valor de k_1 também pode ser determinado.

Como as resinas XAD4 e XAD16 são resinas porosas, sabe-se que a transferência de massa através do meio poroso e da película externa que envolve a partícula são fatores que influenciam a cinética de adsorção. O modelo acima descrito não leva em consideração estas resistências, assim, os valores das constantes estimadas não representam as constantes cinéticas intrínsecas, mas apresentam “embutidas” em seus valores essas resistências. Desta forma, as constantes deste modelo podem ser consideradas como constantes aparentes.

Os valores de k_1 e k_2 estão apresentados na Tabela 4.10.

Tabela 4.10 - Parâmetros calculados e estimados a partir do modelo cinético de primeira ordem para adsorção da cefamicina C em reator de mistura nas resinas XAD4 e XAD16

Resina	K_E	$K_R \times 10^2$ (min^{-1})	R^2	$k_1 \times 10^2$ (min^{-1})	$k_2 \times 10^2$ (min^{-1})
XAD4	0,9577	6,50	0,95	3,18	3,32
XAD16	0,729	9,23	0,94	3,89	5,34

Os valores das constantes de adsorção e dessorção estimados foram maiores para a resina XAD16 que para a XAD4, que vai de acordo com o fato do equilíbrio ser atingido mais rapidamente com esta resina. Assim, apesar do modelo não representar todos os fenômenos físicos envolvidos no processo, os parâmetros estimados mostraram concordância com a tendência mostrada pelos dados experimentais.

4.3.2 - Modelo cinético baseado no balanço de massa do reator, englobando as resistências à transferência de massa

O processo de adsorção considerado neste modelo engloba três etapas: transporte do adsorbato da fase líquida através da película externa que envolve a resina até sua superfície externa; difusão do adsorbato através dos poros da resina; adsorção do adsorbato no sítio ativo livre.

Neste modelo, a cinética intrínseca de adsorção depende das concentrações de cefamicina C livre e do complexo adsorvido, e também dos sítios ativos da resina disponíveis

para adsorção. O modelo matemático cinético representando este mecanismo é mostrado na Equação 4.9.

$$\frac{dq}{dt} = k_{ad} * C(q_m - q) - k_{des} * q \quad (4.9)$$

em que k_{ad} e k_{des} são as constantes cinéticas intrínsecas de adsorção e dessorção, respectivamente; q é a concentração do antibiótico adsorvido na resina e q_m é a capacidade máxima de adsorção da resina.

Para formulação das equações de balanço de massa nas fases líquida e sólida foram assumidas as seguintes hipóteses:

- A partícula de resina é esférica;
- A difusão da cefamicina C nos poros da resina segue a lei de Fick e ocorre apenas na direção radial;
- A adsorção ocorre em condições isotérmicas;
- Mistura perfeita no reator.

Após o balanço de massa na fase fluida, chegou-se a Equação 4.10, que descreve a variação da concentração da cefamicina C (C_L) no reator com o tempo.

$$\frac{dC_L}{dt} = -\frac{3(1-\varepsilon)}{R\varepsilon} K_s (C_L - C|_{r=R}) \quad (4.10)$$

em que R é o raio da partícula de resina, ε é a porosidade do sistema e K_s é o coeficiente de transferência de massa da película.

A condição inicial é $t=0 \rightarrow C_L=C_0$.

O balanço diferencial no interior das partículas sólidas, onde a adsorção ocorre na superfície dos poros, é dado pela Equação 4.11.

$$\frac{\partial C}{\partial t} = D_{ef} \left(\frac{\partial^2 C}{\partial r^2} + \frac{2}{r} \frac{\partial C}{\partial r} \right) - \frac{1-\varepsilon_p}{\varepsilon_p} \frac{\partial q}{\partial t} \quad (4.11)$$

em que D_{ef} é a difusividade da cefamicina C nos poros da resina e ε_p é a porosidade da resina.

As condições iniciais e de contorno para a equação 4.11 são:

$$t = 0 \rightarrow C = q = 0;$$

$$r = 0 \rightarrow \frac{\partial C}{\partial r} = 0;$$

$$r = R \rightarrow \frac{\partial C}{\partial r} = \frac{K_s}{\varepsilon_p D_{ef}} (C_L - C)$$

Para resolução da equação diferencial parcial utilizou-se o método das linhas. As equações foram discretizadas no espaço resultando em um sistema de equações diferenciais ordinárias. A este sistema foram adicionadas a equação de balanço na fase líquida e a equação da cinética intrínseca de adsorção, que foram resolvidas utilizando o método numérico de Rosenbrock, existente nas opções do programa Matlab[®], versão 7.5.0, sob o comando “ode23s”.

Os parâmetros D_{ef} , K_s , k_{ad} , k_{des} e q_m foram otimizados mediante a minimização da função objetivo dada pela equação 4.12. Para isso, foi utilizado o método de Nelder-Mead, cuja função tem o nome “fminsearch” no ambiente de programação Matlab[®], versão 7.5.0.

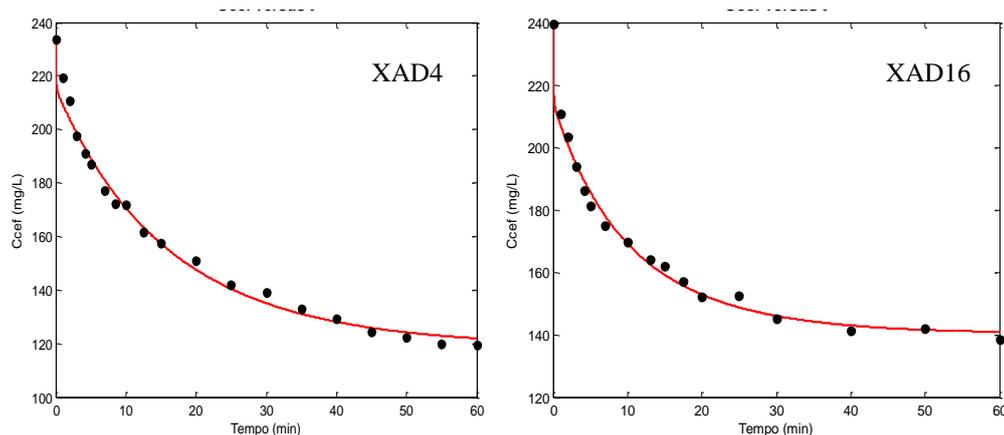
$$\Phi = \sum_{i=1}^N (C_{calc_i} - C_{exp_i})^2 \quad (4.12)$$

Os parâmetros de transferência de massa e cinética intrínseca após o ajuste do modelo podem ser vistos na Tabela 4.11. O ajuste do modelo aos dados experimentais pode ser observado pela Figura 4.23.

Tabela 4.11 - Parâmetros de transferência de massa e cinética intrínseca para adsorção da cefamicina C em reator de mistura.

Resina	$D_{ef} \times 10^8$ (m^2/min)	$K_s \times 10^2$ (m/min)	q_m (mg/g)	$k_{ad} \times 10^4$ ($L/mg/min$)	$k_{des} \times 10^4$ (min^{-1})
XAD4	9,19	2,18	4,67	0,92	252
XAD16	14,32	5,71	12,44	4,13	118

Figura 4.23 - Ajuste do modelo de cinética de adsorção (linha contínua) aos dados experimentais (pontos) para as resinas XAD4 e XAD16



Os parâmetros de transferência de massa D_{ef} e K_s estimados para a resina XAD16 foram maiores que os estimados para a resina XAD4. O valor da constante de adsorção k_{ad} também foi maior. De acordo com estes resultados, tanto a transferência de massa como a cinética intrínseca são mais rápidas para a XAD16, que em conjunto contribuem para a maior velocidade do processo de adsorção nesta resina. A resina XAD16 possui diâmetro de poro maior que a resina XAD4 (respectivamente 150 e 100 Å). Esta diferença provavelmente proporcionou uma maior facilidade de difusão das moléculas de cefamicina C nos poros da XAD16, hipótese que vai de acordo com o maior valor de D_{ef} obtido para esta resina.

Lee, Park e Moon (1997), estudando a adsorção da cefalosporina C em três resinas de mesma matriz polimérica (poliestireno-divinilbenzeno), também estimaram valores maiores de D_{ef} para as resinas de maior diâmetro médio de poro. Os valores obtidos de D_{ef} ($m^2/min \times 10^{-10}$) foram 10,8 para a XAD2 (diâmetro de poro 8,26 nm), 7,2 para a SP207 (diâmetro de poro 6,02 nm) e 5,1 para a SP850 (diâmetro de poro 4,54 nm). Ao contrário do presente trabalho, estes autores utilizaram um modelo de adsorção em coluna para estimativa dos parâmetros cinéticos.

Barboza, Hokka e Maugeri (2002) estudaram a adsorção da cefalosporina C na resina XAD2 (diâmetro de poro 90 Å) em reatores de mistura e obtiveram valores de D_{ef} e K_s com ordens de grandeza semelhantes às obtidas neste trabalho. Os valores obtidos por estes autores foram de $D_{ef} = 1,3 \times 10^{-8} m^2/min$ e $K_s = 4,5 \times 10^{-2} m/min$.

Comparando-se os valores das constantes cinéticas intrínsecas k_{ad} e k_{des} deste modelo e os valores das constantes cinéticas aparentes k_1 e k_2 do modelo de primeira ordem observou-se que houve uma grande diferença nos valores obtidos após o ajuste. Esta diferença mostra que tanto a cinética de adsorção quanto a limitação por transferência de massa devem ser considerados para descrição do fenômeno. Assim, o modelo mais adequado para descrição da cinética de adsorção da cefamicina C nas resinas porosas XAD4 e XAD16 foi o segundo modelo avaliado, que leva em consideração as resistências à transferência de massa.

4.4 - Purificação da Cefamicina C em coluna de leito fixo na resina Amberlite XAD4

Para avaliar a utilização da resina Amberlite XAD4 na purificação da cefamicina C foram realizados experimentos em coluna de leito fixo utilizando na alimentação diferentes fontes de cefamicina: o caldo de cultivo ultrafiltrado, o caldo de cultivo clarificado após adsorção em reator com a resina XAD4 e a fração 1 obtida da troca

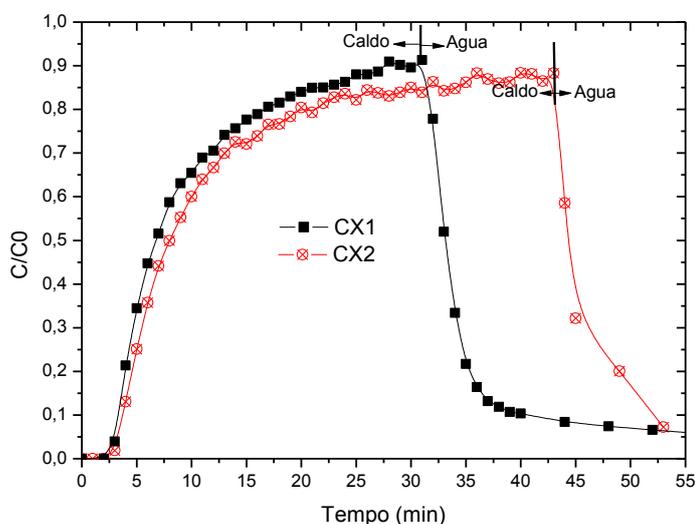
iônica. Os tópicos a seguir abordam os resultados obtidos em cada uma destas etapas avaliadas.

4.4.1- Ensaios em coluna com o caldo de cultivo ultrafiltrado

4.4.1.1 – Obtenção das curvas de ruptura

Primeiramente, foi aplicado um grande volume de caldo em um volume de leito menor, com o intuito de tentar saturar a resina e obter, assim, a curva de ruptura da coluna. No primeiro experimento (CX1) foi aplicado um volume de 150 mL de caldo, com concentração 157,96 mg/L CefC, e no segundo experimento (CX2) foi aplicado um volume de 200 mL de caldo, com concentração 357,13 mg/L de cefamicina C. A Figura 4.24 mostra os resultados obtidos na alimentação da coluna.

Figura 4.24 - Perfis de adsorção da cefamicina C obtidos durante a alimentação da coluna empacotada com a resina Amberlite XAD4



Observou-se que, mesmo aumentando a massa de cefamicina C aplicada, a saturação do leito não foi atingida. O experimento CX2 mostrou que próximo ao valor de C/C_0 em torno de 0,87, houve uma tendência de estabilização da concentração de saída da coluna em torno deste valor. Este comportamento foi bem diferente do observado com a resina Q Sepharose XL, em que a saturação da coluna foi atingida rapidamente, alimentando a coluna com uma massa de cefamicina C menor (~4,5 mg Cef C na CR1). Como a XAD4 é uma resina porosa e a QXL não é, a transferência de massa na XAD4 é mais lenta, requerendo um tempo maior para saturar a resina. Provavelmente, alimentando-se um volume maior de

caldo, ou uma massa maior de cefamicina C, a saturação poderia ser atingida, mas a tendência do gráfico mostra que a saturação será alcançada em um tempo de alimentação muito longo, requerendo um volume de caldo muito grande.

Mesmo não atingindo a saturação da resina, os cálculos dos parâmetros das curvas de ruptura foram realizados, tomando como t_e o tempo no qual C/C_0 atingiu seu maior valor. A Tabela 4.12 apresenta os valores obtidos.

Tabela 4.12 - Parâmetros calculados a partir das curvas de ruptura da cefamicina C em coluna de leito fixo, para a resina XAD4

Parâmetros	CX1	CX2
t_b (min)	3,35	3,71
t_e (min)	28	36
t_t (min)	10,3	12,85
t_u (min)	3,31	3,66
q_t (mg/mL)	0,50	1,36
q_b (mg/mL)	0,16	0,39
H_t (cm)	20,7	21,5
H_b (cm)	6,65	6,12
H_{umb} (cm)	14,05	15,38
ϕ_1	0,32	0,28
ϕ_2	0,99	0,99
P (mg.min⁻¹)	0,291	0,64

Os resultados obtidos para q_t e q_b mostraram que o aumento da concentração da cefamicina C na alimentação favoreceu a adsorção. A quantidade de cefamicina C adsorvida no leito até a saturação da coluna e até o ponto de ruptura foi cerca de 2,5 vezes maior para o experimento CX2, no qual a concentração de cefamicina C na alimentação foi 2,3 vezes maior que no experimento CX1. As capacidades totais de adsorção do leito obtidas para a XAD4 foram maiores que as obtidas para a QXL, o que vai de acordo com os valores do parâmetro q_m do modelo de Langmuir ajustados para estas resinas. Rodriguez (2011) obteve um valor de q_m para a QXL de 0,22 (mg/g), à 20°C e pH 6,8. Neste trabalho, o valor de q_m estimado para a XAD4 à 20°C, pH 2,6, foi de 3,61 (mg/g). As eficiências de utilização do leito ϕ_1 nos

experimentos CX1 e CX2 foram baixas. Isso ocorreu porque o ponto de ruptura aconteceu em um tempo de processo bem menor que o tempo equivalente à capacidade total de utilização do leito. Assim, no tempo correspondente à $C/C_0=0,1$ foram utilizadas cerca de 30% da capacidade de adsorção do leito. Este comportamento pode ser devido à resistência à transferência de massa, que nesta resina tem um peso significativo na cinética de adsorção, como mostrado pelos experimentos de cinética. As curvas cinéticas obtidas em reatores de mistura mostraram que no início do processo, a cinética é mais rápida, mas vai se tornando lenta com a redução dos sítios ativos disponíveis para adsorção e a diminuição da concentração de cefamicina C na fase líquida. As curvas de ruptura obtidas também confirmam este comportamento, pois a variação do C/C_0 com o tempo, ou a inclinação da curva de ruptura, vai diminuindo conforme o leito vai sendo saturado. Por isso o t_b é atingido rapidamente mas t_e é atingido em um tempo bem superior. As eficiências de remoção do produto ϕ_2 foram altas, confirmando a capacidade da resina em reter a cefamicina C e indicando boa afinidade entre a resina e o antibiótico.

A partir dos valores de densidade da resina (ρ_{resina}) e de porosidade do leito (ε), os valores de q_t e q_b , que foram obtidos por volume de leito, puderam ser convertidos para unidades de massa de resina, obtendo-se o valor de q'' , que representa a massa de cefamicina C adsorvida por massa de resina.

Sabendo-se que:

$$V_{resina} = VL(1 - \varepsilon) \quad (4.13)$$

sendo VL o volume de leito da coluna, e

$$V_{resina} = m_{resina}/\rho_{resina} \quad (4.14)$$

então q pode ser expresso como:

$$q = \frac{m_{cefC}}{VL} = \frac{m_{cefC}}{V_{resina}}(1 - \varepsilon) = \frac{m_{cefC}}{m_{resina}/\rho_{resina}}(1 - \varepsilon) \quad (4.15)$$

Rearranjando:

$$q = \rho_{resina}(1 - \varepsilon) \frac{m_{cefC}}{m_{resina}} = \rho_{resina}(1 - \varepsilon)q'' \quad (4.16)$$

Isolando-se q'' da equação 4.16 obtém-se uma relação para cálculo de q'' em função do q :

$$q'' = \frac{q}{\rho_{resina}(1 - \varepsilon)} \quad (4.17)$$

A densidade específica da resina XAD4, de acordo com as informações do fabricante, varia de 1,01 a 1,03. Levando em consideração o valor médio da densidade específica e a densidade da água à 20°C (998,21 kg/m³), a densidade da resina foi calculada obtendo-se o valor de 1018,17 kg/m³. A porosidade do leito não foi determinada neste trabalho. Para o cálculo de q'' utilizou-se o valor determinado por Bautista et al. (2006) para uma coluna empacotada com a resina XAD4, que foi de 0,63.

A partir da equação 4.17, os valores calculados para o experimento CX1 foram q_t''=1,32 (mg/g) e q_b''= 0,43 (mg/g) , e para o experimento CX2 foram de q_t''= 3,6 (mg/g) e q_b''= 1,03 (mg/g). O ajuste da isoterma ao modelo de Langmuir para a XAD4, pH 2,64 à 20°C retornou um valor de q_m=3,61 (mg/g), que foi o mesmo obtido para q_t'' no experimento CX2. Estes resultados sugerem que, neste ensaio, a resina foi utilizada próxima da sua capacidade máxima de adsorção. Já no experimento CX1, no qual a concentração de cefamicina C na alimentação foi menor, a saturação máxima possível da resina não foi atingida. Cabe ressaltar que os valores de q'' calculados representam valores estimados já que a porosidade real do leito não foi determinada.

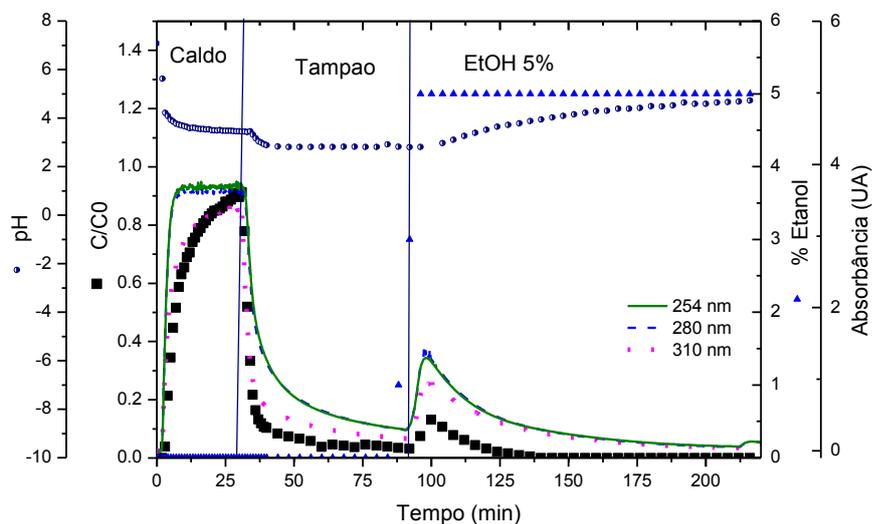
4.4.1.2 – Adsorção e eluição da cefamicina C em coluna de leito fixo

A Figura 4.25 apresenta os resultados da lavagem e eluição da coluna no experimento CX1.

Comparando-se os picos obtidos na alimentação da coluna e na eluição, observou-se que grande parte da cefamicina C aplicada não foi adsorvida. 93,5 % da cefamicina C saiu durante a alimentação e lavagem, e somente 6,4% foi adsorvida na coluna. Como discutido anteriormente, este comportamento pode ser devido à alta resistência à transferência de massa nesta resina. A eluição com solução de EtOH 5% foi capaz de desorver a cefamicina C, e as medidas de absorbância nos comprimentos de onda avaliados acompanharam o pico da cefamicina C, dando evidências de que não houve separação da cefamicina C de outros compostos que também absorvem nos comprimentos de onda monitorados. Neste ensaio, obteve-se um FR total de 93,6%, sendo que 67,5% da cefamicina C aplicada saiu da coluna durante a etapa de alimentação, 20,1% durante a lavagem e 6,0% durante a eluição. Parte da cefamicina C aplicada foi perdida (6,4%), sendo que esta perda

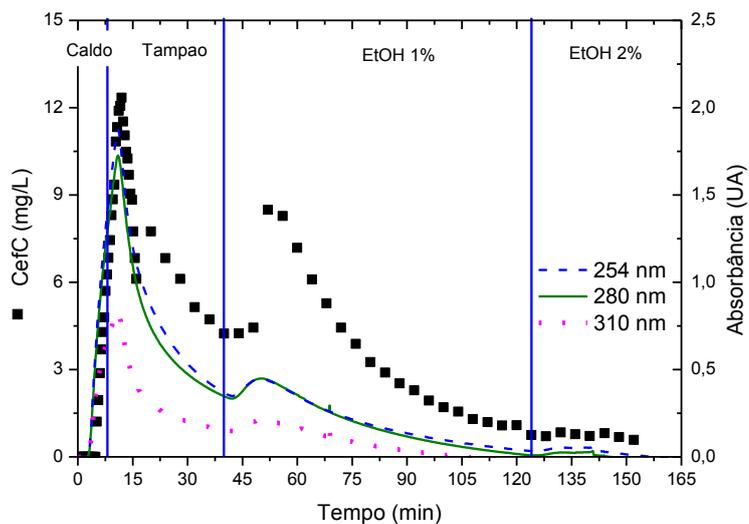
pode ser devido a degradação do composto ou então à incapacidade da solução de etanol 5% em desorver toda cefamicina C adsorvida.

Figura 4.25 - Perfil de adsorção e eluição da cefamicina C presente em caldo de cultivo, em coluna empacotada com a resina Amberlite XAD4, a uma vazão de alimentação e eluição de 5,0 mL/min, 20°C, caldo pH 3,42



Para avaliar se concentrações menores de solução de EtOH seriam capazes de separar diferentes compostos, outro experimento em coluna foi conduzido (CX3), utilizando na eluição concentrações crescentes de EtOH. A Figura 4.26 apresenta os resultados da adsorção e eluição obtidos.

Figura 4.26 - Perfil de adsorção e eluição da cefamicina C presente em caldo de cultivo, em coluna empacotada com a resina Amberlite XAD4, a uma vazão de alimentação e eluição de 5,0 mL/min, 20°C, caldo pH 2,81



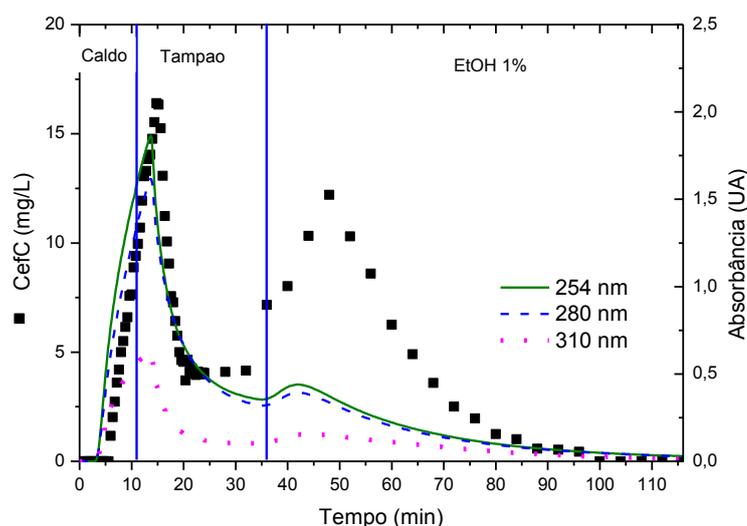
Neste experimento, a cefamicina C foi praticamente toda desorvida ao passar a solução de EtOH 1%, obtendo-se um pico bem largo. Como no experimento anterior (CX1),

as medidas de absorvância nos três comprimentos de onda acompanharam o pico da cefamicina C, indicando que a eluição, nas concentrações utilizadas, não foi capaz de separar compostos diferentes presentes no caldo. Neste ensaio, o FR total da cefamicina C foi de 71,9%, menor que no ensaio anterior. O FR na etapa de alimentação foi de 2,3%, na lavagem de 29,4% e na eluição de 40,2%.

4.4.2 - Ensaio em coluna com o caldo de cultivo clarificado

Os resultados obtidos quando foi aplicado na coluna o caldo clarificado podem ser vistos na Figura 4.27.

Figura 4.27- Perfil de adsorção e eluição da cefamicina C presente em caldo de cultivo, em coluna empacotada com a resina Amberlite XAD4, a uma vazão de alimentação e eluição de 5,0 mL/min, 20°C, caldo pH 2,81

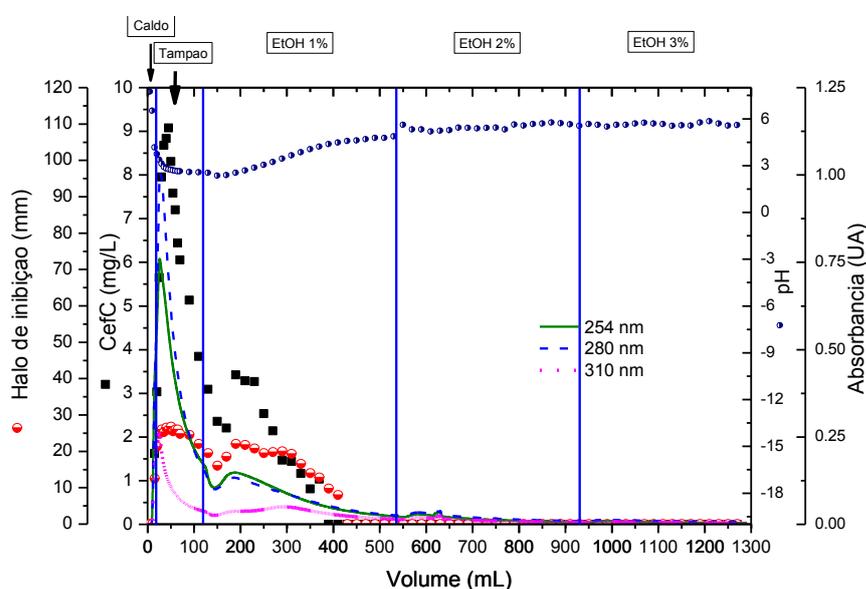


Como pode ser observado, os perfis de adsorção e eluição foram semelhantes ao obtido quando a alimentação consistiu do caldo ultrafiltrado. A cefamicina C começou a ser eluída durante a passagem do tampão pelo leito da coluna, finalizando a desorção ao passar a solução de etanol 1%. As medidas de absorvância também não mostraram picos sendo separados do pico da cefamicina C. Assim, conclui-se que a etapa de retirada de contaminantes do caldo pela adsorção na resina XAD4 em reator não promoveu diferenças significativas no processo posterior de purificação em coluna com esta mesma resina, apesar desta etapa promover uma clarificação do caldo, como discutido por Baptista Neto et al. (2012) e mostrado neste trabalho. Neste experimento, o FR total da cefamicina C foi de 91,4%, sendo que 4,6% foram recuperadas na alimentação, 31,7% na lavagem e 55,1% na eluição.

4.4.3 - Ensaios em coluna com a fração 1 oriunda da coluna de troca iônica

Nestes ensaios, a alimentação da coluna foi feita com a fração 1 obtida do processo de troca iônica. A Figura 4.28 apresenta os resultados obtidos no primeiro ensaio (CX5).

Figura 4.28 - Perfil de adsorção e eluição de compostos com atividade antibacteriana presentes na fração 1, em coluna de leito fixo com a resina Amberlite XAD4, a uma vazão de alimentação e eluição de 5,0 mL/min, 20°C, caldo pH 2,68.



Pôde-se observar que a cefamicina C foi muito pouco retida na coluna, como no experimento CX3. Já no final da alimentação e durante toda a lavagem foi detectada cefamicina C na saída da coluna, e o pico obtido na lavagem foi muito maior que o pico obtido na eluição. As frações com atividade antimicrobiana foram completamente eluídas ao passar solução de EtOH 1%, como no experimento CX3. A medida do halo de inibição apresentou, na eluição, um pico diferenciado do pico da cefamicina C. O primeiro apresentou dois picos adjacentes que não estão completamente separados, e o pico da cefamicina apresentou apenas um ponto de máximo. Observando as medidas da absorbância, as medidas nos comprimentos de onda 254 e 280 nm acompanharam o pico da cefamicina C. Já a medida no comprimento de onda de 310 nm apresentou um pico com ponto de máximo deslocado do pico da cefamicina, mas coincidindo com o segundo pico detectado pelo bioensaio. Esta diferença pode ser uma indicação de que está havendo uma separação parcial da cefamicina C de outro composto (ou outros compostos) presentes na fração 1.

O FR da cefamicina C neste experimento foi de 0,5% na alimentação, 41,3% na lavagem e 32,7% na eluição, correspondendo a uma recuperação total de 74,6%.

Como foi discutido anteriormente, a troca iônica possibilitou uma purificação significativa da cefamicina C, e possivelmente, os contaminantes ainda presentes são compostos de estrutura molecular muito similar à da cefamicina C, como os intermediários da rota biossintética, a desacetilcefalosporina C e a desacetoxicefalosporina C, que também são cefalosporinas (OSTER et al., 2006). A diferença na estrutura destes compostos está apenas no grupo metoxila, presente somente na cefamicina C, e na cadeia lateral ligada ao anel dihidrotiazina. Estes dois compostos também possuem atividade antimicrobiana e podem ser um dos compostos detectados pelo bioensaio nas cromatografias realizadas (HIGGENS et al., 1974)

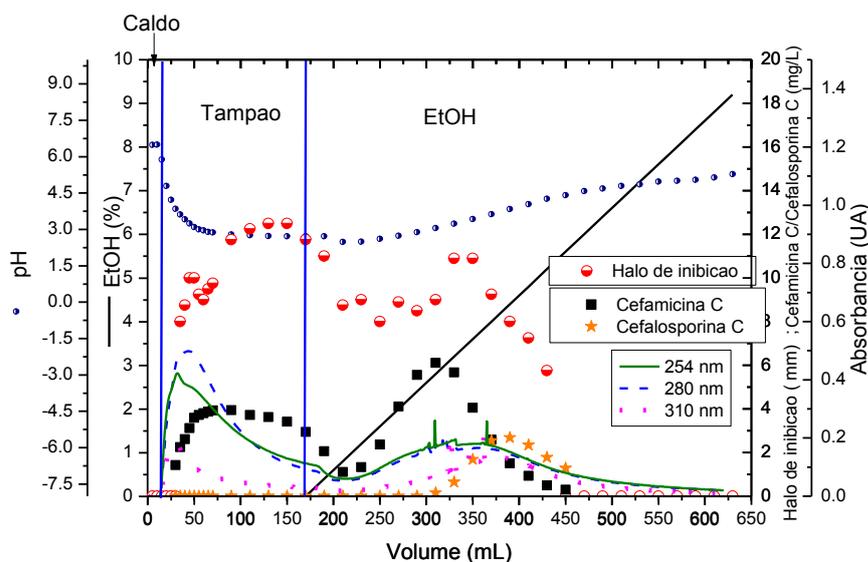
Na rota biossintética da cefalosporina C, a desacetilcefalosporina C e a desacetoxicefalosporina C também estão presentes (BRAKHAGE et al., 2005). No processo de purificação, a separação da cefalosporina destes compostos pode ser alcançada utilizando resinas poliméricas neutras com a mesma estrutura da XAD4, constituídas de polímeros de poliestireno/divinilbenzeno. Bautista et al. (2006) estudaram a adsorção da cefalosporina C e da desacetilcefalosporina C nas resinas Amberlite XAD4 e Amberlite XAD2, e em outras resultantes da modificação química destas mesmas resinas. Os autores conseguiram fatores de separação maiores que 1 para estes dois compostos, sendo que o melhor resultado foi obtido com a resina XAD2-Br, resultado que viabiliza a utilização destas resinas neste processo de purificação em coluna. A separação da desacetilcefalosporina C, desacetoxicefalosporina C e cefalosporina C também foi alcançada utilizando colunas empacotadas com as resinas Amberlite XAD16 e XAD18 (FISHER et al., 2011). Apesar de essas resinas possuírem mesma estrutura química, elas diferenciam-se entre si pela área superficial, pelo diâmetro de poro e diâmetro médio de partícula, parâmetros que também interferem na eficiência da separação.

Como estes intermediários não estão disponíveis no mercado para aquisição, propôs-se a adição de cefalosporina C à fração 1 para verificar se a cromatografia em resina XAD4 seria capaz de separar a cefamicina C da cefalosporina C. A cefalosporina C estaria simulando a presença dos intermediários citados.

No primeiro experimento em coluna utilizando a cefalosporina C, foi feita a eluição em gradiente linear de solução de etanol (Figura 4.29), para verificar quais concentrações de etanol deveriam ser usadas para obter a separação dos compostos monitorados. Como observado no experimento anterior, a cefamicina C foi pouco adsorvida,

sendo que grande parte do composto aplicado saiu na lavagem com água. Já a cefalosporina aplicada foi totalmente adsorvida, já que não foi detectada na saída da coluna durante as etapas de alimentação e lavagem. Ao iniciar a eluição, a cefamicina C começou a ser desorvida em uma concentração de eluente em torno de 1% EtOH. Já a cefalosporina só foi desorvida em uma concentração próxima de 3% EtOH. As medidas de absorvância nos comprimentos de onda 254 e 280 nm acompanharam o pico da cefamicina C, enquanto que a medida no comprimento de onda de 310 nm acompanhou o pico da cefalosporina C. Este comportamento fortalece a suspeita de que alguns dos contaminantes presentes na fração 1 sejam realmente os intermediários citados.

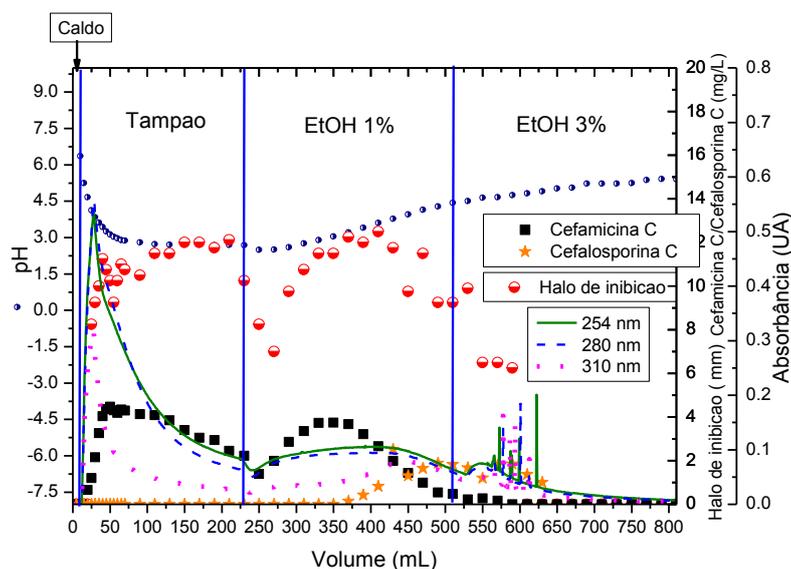
Figura 4.29- Perfil de adsorção e eluição da fração 1 adicionada de cefalosporina C em coluna de leito fixo empacotada com a resina Amberlite XAD4, a uma vazão de alimentação e eluição de 5,0 mL/min, 20°C, caldo pH 2,68. Eluição em gradiente linear de solução de EtOH.



O FR total da cefamicina C neste experimento foi de 74,8%, sendo que 29,3% foram recuperadas durante a lavagem e 45,5% durante a eluição.

Determinada a concentração em que cada um dos antibióticos é eluído da coluna, outro experimento em coluna semelhante foi realizado, mas agora utilizando eluição gradiente em degrau – primeiramente eluindo com solução 1% EtOH, em seguida com solução 3% EtOH. Os resultados obtidos podem ser vistos na Figura 4.30.

Figura 4.30 - Perfil de adsorção e eluição da fração 1 adicionada de cefalosporina C em coluna de leito fixo empacotada com a resina Amberlite XAD4, a uma vazão de alimentação e eluição de 5,0 mL/min, 20°C, caldo pH 2,68. Eluição em gradiente degrau de solução de EtOH.



Neste ensaio, o FR total da cefamicina C foi de 68,3%, os FR da lavagem e eluição foram, respectivamente, 35,5% e 32,8%.

A cefamicina C foi completamente eluída ao passar a solução 1% EtOH. A cefalosporina começou a ser eluída também nesta concentração de eluente, terminando a desorção ao passar a solução 3% EtOH. As primeiras frações da eluição da cefamicina C não continham cefalosporina C, assim como as últimas frações de cefalosporina não continham cefamicina C. Assim, o método proposto foi capaz de separar estes dois compostos, e talvez também seja capaz de separar a cefamicina C da desacetilcefalosporina C e a desacetoxicefalosporina C.

4.5 – Purificação da Cefamicina C em coluna de leito fixo na resina Amberlite XAD16

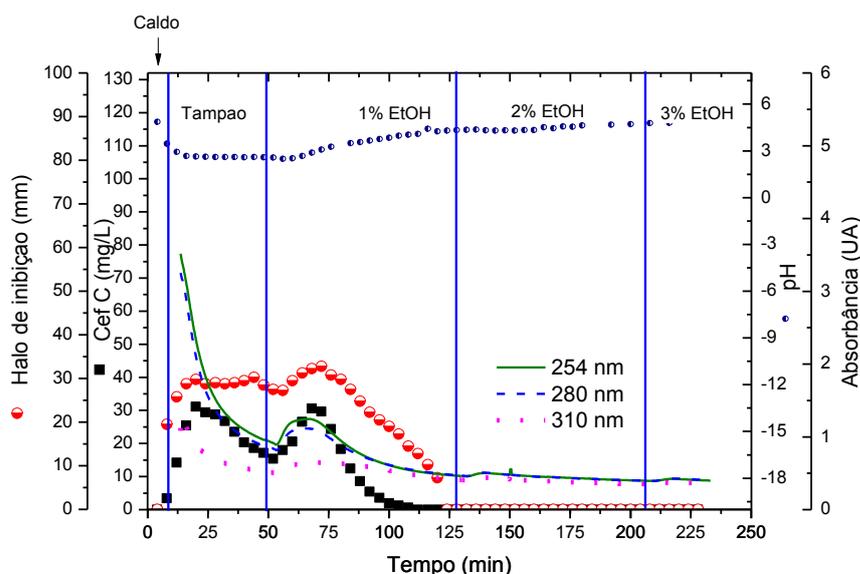
As resinas XAD4 e XAD16 são constituídas da mesma matriz de poliestireno divinilbenzeno. Elas diferem entre si na área superficial e distribuição de tamanho de poros, que podem levar a diferenças na capacidade de adsorção e na seletividade do material. Baseado nestas diferenças e nos resultados obtidos por Fisher, Maikner e Gehris (2011), que conseguiram a separação da cefalosporina C da desacetilcefalosporina C e da desacetoxicefalosporina C utilizando processo em coluna com a resina Amberlite XAD16, decidiu-se também avaliar esta resina na purificação da cefamicina em coluna. Para a XAD16, foram repetidos os ensaios em coluna feitos com a XAD4, utilizando na alimentação o caldo

ultrafiltrado, a fração 1 obtida da coluna de troca iônica com a QXL e a fração 1 adicionada de cefalosporina C.

4.5.1-. Purificação do caldo de cultivo contendo cefamicina C

A Figura 4.31 apresenta os resultados obtidos utilizando como alimentação da coluna o caldo ultrafiltrado. Para a resina XAD16, não foi feita eluição com solução de etanol 5%. Como foi observado na coluna com a resina XAD4 que a cefamicina C era desorvida em concentração menor de etanol (1%), escolheu-se primeiramente este valor para avaliar a eluição com a resina XAD16.

Figura 4.31 – Perfil de adsorção e eluição da cefamicina C e compostos com atividade antibacteriana presentes no caldo ultrafiltrado, em coluna de leito fixo com a resina Amberlite XAD16, a uma vazão de alimentação e eluição de 5,0 mL/min, 20°C, caldo pH 2,68.

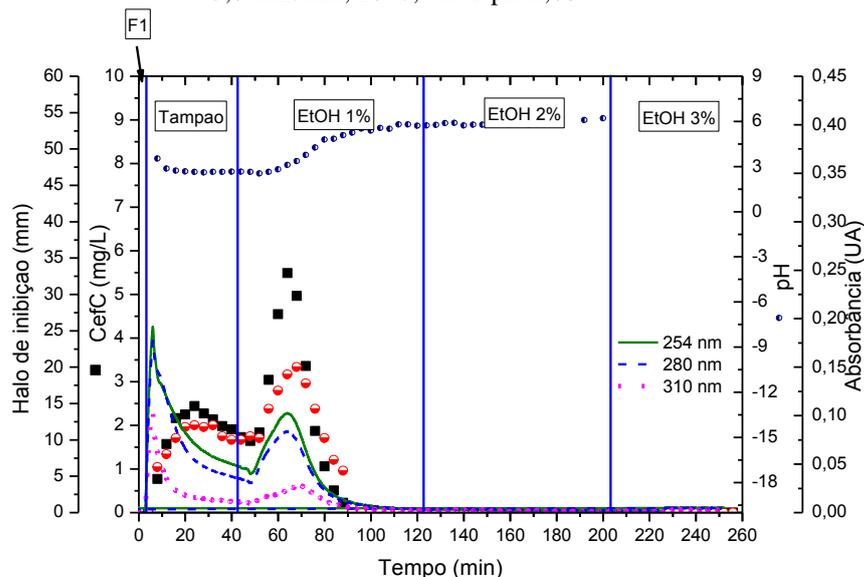


Como ocorreu na XAD4, a cefamicina começou a desorver da coluna já na etapa de lavagem com o tampão, terminando a desorção ao passar a solução de etanol 1%. Não houve a separação de diferentes picos e as medidas de absorvância nos comprimentos de onda monitorados seguiram o perfil de cefamicina C na saída da coluna. Como não foram detectados picos na eluição nas concentrações maiores de etanol (2% e 3%), não foi feito outro experimento de coluna utilizando etanol 5% na eluição. O FR total da cefamicina C neste experimento foi de 79,1%, sendo que 0,6% foram recuperadas durante a alimentação, 43,5% durante a lavagem e 35,0% durante a eluição.

4.5.2-. Purificação da cefamicina C presente na fração 1 oriunda da coluna de troca iônica

O experimento em coluna utilizando a fração 1 na alimentação mostrou um deslocamento do pico da cefamicina C em relação ao pico correspondente à medida no espectro no comprimento de onda de 310 nm (Figura 4.32). Nos outros comprimentos de onda monitorados, os picos coincidiram com o da cefamicina. Este comportamento foi o mesmo observado na coluna com a resina XAD4, ou seja, alguns compostos que absorvem luz em 310 nm foram mais retidos na coluna que a cefamicina C. Neste ensaio, o FR total da cefamicina C foi de 86,0%, sendo que 35,0% foram recuperadas na lavagem e 51,0% na eluição.

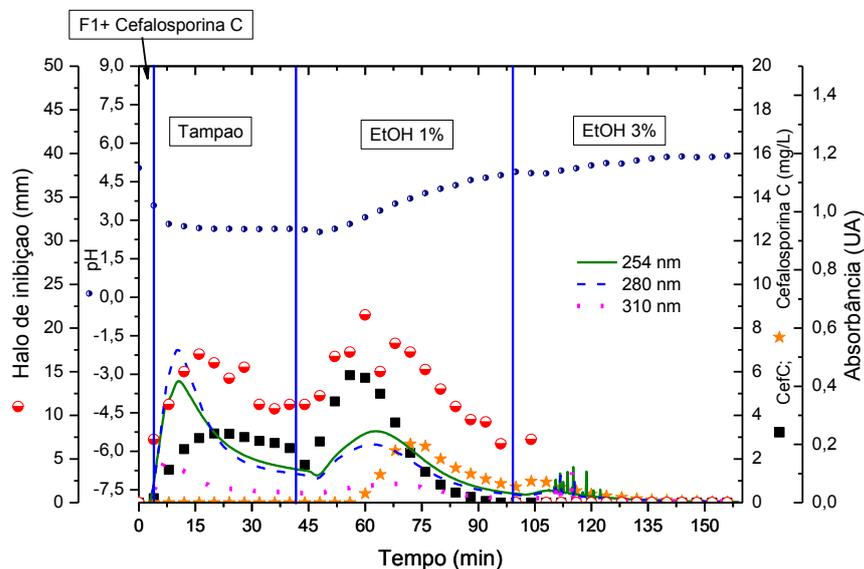
Figura 4.32 - Perfil de adsorção e eluição da cefamicina C e compostos com atividade antibacteriana presentes na fração 1, em coluna de leito fixo com a resina Amberlite XAD16, a uma vazão de alimentação e eluição de 5,0 mL/min, 20°C, caldo pH 2,68.



O processo em coluna com a resina XAD16 também foi capaz de separar a cefamicina C da cefalosporina C (Figura 4.33). Como aconteceu com a XAD4, a cefamicina C começou a ser eluída ainda na lavagem com o tampão, livre de cefalosporina C. As frações iniciais da eluição com etanol 1% também continham apenas cefamicina. A cefalosporina C foi mais retida na coluna, mas também começou a ser eluída ao passar a solução de etanol 1%. As frações finais de cefalosporina C, eluídas em etanol 3%, estavam livres de cefamicina C.

Neste ensaio, o FR total da cefamicina C foi de 88,0%, os FR da lavagem e eluição foram, respectivamente, 37,0% e 52,0%.

Figura 4.33 - Perfil de adsorção e eluição da cefamicina C, cefalosporina C e compostos com atividade antibacteriana presentes na fração 1 adicionada de cefalosporina, em coluna de leito fixo com a resina Amberlite XAD16, a uma vazão de alimentação e eluição de 5,0 mL/min, 20°C, caldo pH 2,68.



4.6 – Comparação entre os processos em coluna com as resinas XAD4 e XAD16

A Tabela 4.13 apresenta os valores dos momentos - μ , σ^2 - e das eficiências de separação (ES) obtidos para a cefamicina C e a medida de contaminantes no comprimento de onda de 310 nm.

As eficiências de separação foram similares para os experimentos CX1 e CX4, em que foram utilizados na alimentação da coluna o caldo ultrafiltrado e o caldo clarificado, e soluções de EtOH 5 e 1% durante a eluição, respectivamente. Estes resultados mostraram que a pré-purificação do caldo não influenciou na separação da cefamicina C dos contaminantes monitorados no comprimento de onda de 310 nm.

A redução da concentração de etanol no eluente não alterou a eficiência de separação, mas aumentou a largura do pico da cefamicina C. Os resultados obtidos nos experimentos CX1 e CX4 mostraram que houve um aumento no valor de σ^2 ao reduzir a concentração de etanol de 5 para 1%. Nos adsorventes poliméricos, geralmente os solventes utilizados na eluição são adsorvidos no adsorvente e em muitos casos eles penetram na matriz polimérica, resultando em um deslocamento por solvente dos componentes adsorvidos (LEE, PARK e MOON, 1997). Considerando este mecanismo, seria necessário que o etanol penetrasse nos poros da resina para deslocar a cefamicina C adsorvida e então ficar adsorvido

no sítio ativo. Como o fluxo difusivo é proporcional ao gradiente de concentração, quanto maior a concentração de etanol na fase líquida, maior o fluxo de difusão deste solvente nos poros da resina. Provavelmente por isso a dessorção total da cefamicina C na concentração de 5% de etanol foi atingida mais rapidamente, resultando em um pico mais estreito. Lee, Park e Moon (1997) também observaram uma diminuição na largura e aumento na altura do pico de dessorção da cefalosporina C ao aumentar a concentração de isopropanol no eluente.

Tabela 4.13 - Valores dos momentos e eficiências de separação calculados para os picos da cefamicina C e o pico correspondentes à absorvância no $\lambda=310$ nm nos experimentos em coluna com as resinas XAD4 e XAD16.

Experimento/ Resina	Alimentação	Eluição	μ_1	σ_1^2	μ_2	σ_2^2	ES
CX1/ XAD4	Caldo ultrafiltrado	EtOH 5%	106,63	94,62	115,24	260,4	0,69
CX3/ XAD4*	Caldo ultrafiltrado	EtOH 1%	71,63	374,15	-	-	-
CX4/ XAD4	Caldo clarificado	EtOH 1%	52,02	170,2	62,08	395,9	0,62
CX5/ XAD4	Fração 1 QXL	EtOH 1%	49,19	108,42	63,82	410,49	1,01
CX6/ XAD4	Fração 1 + cefalosporina	Gradiente linear EtOH	63,26	84,92	75,61	199,01	1,08
CX7/XAD4	Fração 1 + cefalosporina	EtOH 1% e 3%	72,37	178,12	88,19	366,5	0,99
CX8/XAD16	Caldo ultrafiltrado	EtOH 1%	70,45	132,54	90,36	488,54	1,25
CX9/XAD16	Fração 1 QXL	EtOH 1%	64,38	74,08	69,11	137,23	0,47
CX10/XAD16	Fração 1 + cefalosporina	EtOH 1% e 3%	64,42	89,64	69,88	176,3	0,49

*Não foi possível calcular os momentos para o pico de medida de absorvância a 310nm porque ao final da eluição a absorvância apresentou valores negativos.

Para a cefamicina C, a resina XAD16 proporcionou picos mais estreitos que a XAD4, verificado pelos menores valores de σ^2 obtidos com a primeira resina. Esse comportamento pode ser devido ao maior tamanho dos poros da XAD16 em relação à XAD4, o que facilita a difusão das moléculas de cefamicina C no interior da partícula. Os resultados

obtidos nos ensaios cinéticos de adsorção reforçam esta hipótese, já que o coeficiente de difusão estimado para a XAD16 foi maior que para a XAD4. Apesar da maior variância no tempo de retenção dos picos, a resina XAD4 apresentou, em geral, maiores eficiências de separação que a resina XAD16, em relação aos contaminantes monitorados.

As eficiências de separação entre a cefamicina C e a cefalosporina C também foram calculadas para os experimentos CX6, CX7 e CX10 (Tabela 4.14).

Tabela 4.14 - Valores dos momentos e eficiências de separação calculados para os picos da cefamicina C e da cefalosporina C nos experimentos em coluna com as resinas XAD4 e XAD16

Experimento/ Resina	Alimentação	Eluição	μ_1	σ_1^2	μ_2	σ_2^2	ES
CX6/XAD4	Fração 1 + cefalosporina	Gradiente linear EtOH	63,26	84,92	78,39	46,96	1,90
CX7/XAD4	Fração 1 + cefalosporina	EtOH 1% e 3%	72,37	178,12	102,59	185,26	2,24
CX10/XAD16	Fração 1 + cefalosporina	EtOH 1% e 3%	64,42	89,64	90,45	357,49	1,95

Novamente, a maior eficiência de separação foi obtida com a resina XAD4 quando foi utilizado gradiente degrau de etanol na eluição. Mas o maior valor foi obtido porque na resina XAD16 a dispersão do pico da cefalosporina C foi muito alta, aumentando muito o valor do denominador no cálculo da ES (equação 3.23) e resultando, assim, em um valor de ES menor. Como estes três experimentos tiveram volumes de leito da coluna e volumes das soluções de alimentação e lavagem semelhantes, os valores de μ podem ser comparados. A retenção da cefamicina C na resina foi maior na coluna com a resina XAD4, comparando os experimentos CX7 e CX10, ambos com o mesmo método de eluição. Este comportamento também pode ser devido a maior resistência difusional oferecida pelos poros de menor diâmetro da XAD4. A eluição em modo gradiente linear diminuiu a retenção da cefamicina C e da cefalosporina C e também a dispersão dos respectivos picos. Como neste modo de eluição a força de eluente aumenta gradualmente com o tempo, o aumento da concentração de etanol favoreceu a dessorção dos componentes.

A Tabela 4.15 apresenta os fatores de recuperação da cefamicina C livre de cefalosporina C nos experimentos em que este último antibiótico foi adicionado à alimentação. Estes valores foram calculados para as etapas de lavagem e eluição e o valor

total representa a soma dos dois anteriores. Foram medidos também o volume total de frações em que esta cefamicina foi coletada e a concentração final obtida.

Tabela 4.15 - Fatores de recuperação da cefamicina C totalmente separada da cefalosporina C nos ensaios em coluna com as resinas XAD4 e XAD16.

Experimento/ Resina	Fator de recuperação da Cefamicina C livre de cefalosporina C (%)			Volume total (mL)	Concentração (mg/L)
	Lavagem	Eluição	Total		
CX6/ XAD4	29,28	19,7	48,97	265	3,7
CX7/XAD4	35,53	17,12	52,65	335	3,13
CX10/XAD16	36,57	22,45	59,01	280	5,91

Aproximadamente metade da cefamicina C aplicada no leito é recuperada livre de cefalosporina C. Como a cefalosporina permanece retida no leito durante a lavagem da coluna, nesta etapa há separação completa dos dois antibióticos e é o período no qual a maior parte da cefamicina C é recuperada.

Como a resina XAD16 provoca menor dispersão dos picos dos antibióticos, a cefamicina C foi recuperada em um menor volume de frações e conseqüentemente, esta resina forneceu soluções mais concentradas em cefamicina C que a XAD4. Apesar da purificação obtida, o processo levou a uma diluição do antibiótico em relação à concentração na alimentação e por isso uma etapa posterior de concentração deve ser empregada, como a nanofiltração, por exemplo.

Levando em consideração os resultados de equilíbrio e cinética de adsorção e os resultados dos processos em coluna, a resina XAD16 apresentou vantagens em relação à XAD4. Além de ter apresentado capacidades de adsorção e afinidades ligeiramente maiores que a XAD4, a cinética nesta resina foi mais rápida e esta característica influenciou nos processos em coluna, em que foram obtidos picos mais estreitos contendo cefamicina C, e por conseqüência, frações mais concentradas.

4.7 – Considerações finais

Os processos de purificação estudados neste trabalho mostraram-se eficientes na obtenção de uma fração purificada contendo cefamicina C. Os processos em coluna empregando primeiramente a troca iônica seguida da adsorção em fase estacionária C18

mostrou uma purificação significativa, sendo observada pela visualização dos cromatogramas a 254 nm das frações coletadas, em que há quase que exclusivamente o pico da cefamicina C, e pelos resultados de espectrometria de massas, em que houve diminuição dos contaminantes presentes no caldo inicial. Os processos em coluna utilizando a troca iônica seguida da adsorção nas resinas neutras XAD4 ou XAD16 também se mostraram eficientes. Nestes processos alcançou-se a separação parcial do pico da cefamicina C e do pico correspondente à medida de absorção no comprimento de onda de 310 nm, e na separação da cefamicina C e da cefalosporina C.

Como a avaliação da separação e purificação dos processos envolvendo a adsorção no adsorvente C18 e nas resinas XAD4 e XAD16 foram diferentes, não foi possível avaliar qual deles foi mais eficiente. Levando em consideração o custo do processo e a utilização de reagentes e solventes menos nocivos ao meio ambiente, o processo sugerido após a etapa de troca iônica é a coluna de leito fixo com a resina XAD16. A adsorção no cartucho de SPE C18 envolveu o uso de metanol, que é um solvente tóxico, e o custo da fase estacionária é muito maior que o custo das resinas poliméricas.

Assim, o processo proposto para purificação da cefamicina C a partir do caldo de cultivo envolve as seguintes etapas: centrifugação, microfiltração e ultrafiltração para retirada de insolúveis e macromoléculas de tamanho maior que 3 KDa; adsorção em reator de mistura utilizando a resina Amberlite XAD4, pH 6,6, para retirada de contaminantes; troca iônica em coluna de leito fixo utilizando a resina Q Sepharose XL; adsorção em coluna de leito fixo utilizando a resina Amberlite XAD16.

5. CONCLUSÕES

As curvas de ruptura realizadas para o processo de troca iônica na resina QXL mostraram que a variação da vazão de alimentação e de eluição no intervalo de 2,5 mL/min a 7,5 mL/min não influenciou nas eficiências de recuperação do produto e de utilização do leito, nem nos picos obtidos na eluição da coluna. Foram obtidos altos valores de eficiência de utilização do leito e de recuperação do produto, entre 92 e 99%. A vazão de 7,5 mL/min é a mais indicada para ser usada no processo, já que proporcionou uma maior produtividade.

A eluição da coluna com a resina QXL no modo isocrático, com solução de NaCl 1%, também possibilitou a separação de dois picos com atividade antimicrobiana, como no método gradiente em degrau previamente desenvolvido. Este modo de eluição isocrático mostrou-se mais adequado, pois a cefamicina C adsorvida é recuperada em um pico de menor volume de solução, estando, assim, mais concentrada que no método anterior. Além disso, no modo de eluição isocrático a duração do processo é menor.

A partir dos resultados da análise de espectrometria de massas, conclui-se que o processo de troca iônica seguido da adsorção em fase estacionária C18 foi capaz de separar a cefamicina C de um (ou mais) composto(s) com a razão m/z correspondente à molécula de lisina e diminuir a concentração de compostos com as razões m/z correspondentes às moléculas dos contaminantes penicilina N, deacetilcefalosporina C e deacetoxicefalosproina C.

As isotermas de adsorção realizadas com as resinas poliméricas neutras XAD4 e XAD16 mostraram que o aumento do pH desfavorece a adsorção da cefamicina C. A melhor condição de pH encontrada para a adsorção foi em torno de 2,6, na temperatura de 15°C. Para valores de pH acima de 4,6 a adsorção foi muito baixa e nesta faixa de pH a adsorção não pareceu ser influenciada pela temperatura.

O modelo de Langmuir mostrou-se adequado para descrição dos resultados experimentais de equilíbrio nos valores de pH próximos a 2,6. Nas outras condições de pH estudadas (4,6 e 6,6) o modelo linear foi o mais apropriado para descrever o equilíbrio de adsorção.

A afinidade da cefamicina C pela resina XAD16 foi um pouco maior que pela resina XAD4. O aumento da temperatura de 15 para 30°C levou a uma redução na afinidade, nas condições de pH próximas a 2,6. Nas outras condições de pH, houve uma tendência de pequena redução da afinidade com o aumento da temperatura, exceto para a resina XAD4 à

30°C. Comparando com outros antibióticos, a cefamicina C tem uma afinidade menor por estas resinas.

A cinética de adsorção e dessorção da cefamicina C na resina XAD16 foi mais rápida que na XAD4. Os valores dos coeficientes de transferência de massa - difusividade e coeficiente de película – obtidos após ajuste ao modelo cinético de adsorção foram maiores para a XAD16.

Os experimentos em colunas de leito fixo com as resinas XAD4 e XAD16 mostraram que a cefamicina C é pouco retida no leito. Entretanto, das análises das curvas de ruptura para a resina XAD4 observou-se que a capacidade de retenção no leito pode ser aumentada com o aumento da concentração inicial da cefamicina C na alimentação. A XAD4 apresentou maiores capacidades de retenção que a QXL, mas a eficiência de utilização do leito foi menor, de cerca de 30%.

Quando foram utilizados na alimentação da coluna o caldo ultrafiltrado ou caldo clarificado, e na eluição as soluções de EtOH 1 ou 5%, os processos em coluna com as resinas XAD4 e XAD16 não proporcionaram a separação da cefamicina C de outros compostos monitorados no experimento. Já os processos em coluna com as duas resinas, utilizando como alimentação a fração 1, oriunda da troca iônica, adicionada de cefalosporina C, e a eluição com solução de EtOH 1% e 3% promoveram a separação da cefamicina C e da cefalosporina C.

Nos experimentos em que foi adicionado cefalosporina C na alimentação, a análise dos processos por meio da teoria dos momentos mostrou que o tempo de retenção da cefamicina C na coluna da XAD4 foi ligeiramente maior que na XAD16. Durante a eluição, a dispersão dos picos na resina XAD16 foi menor, o que levou à obtenção de uma fração purificada mais concentrada em cefamicina C.

Os resultados de afinidade, capacidade de adsorção e eficiências de separação das resinas XAD4 e XAD16 obtidos neste trabalho foram semelhantes, mas a XAD16 se diferenciou por oferecer menor resistência à transferência de massa e cinéticas de adsorção e dessorção mais rápidas. Estas características levaram a obtenção de picos com menor dispersão e mais concentrados nos processos em coluna.

Os processos em coluna estudados neste trabalho, empregando a troca iônica com a resina QXL seguida de adsorção em sílica C18 empacotada no cartucho SPE, ou troca iônica com a resina QXL seguida da adsorção em resinas poliméricas neutras (XAD4 ou XAD16) apresentaram seletividade e capacidade de resolução suficientes para separar a cefamicina C de compostos com estruturas químicas muito semelhantes entre si. Ao final,

foram obtidas frações contendo cefamicina totalmente ou parcialmente separadas de alguns contaminantes presentes no caldo (lisina, penicilina N, desacetilcefalosporina C e desacetoxicefaloaporina C) e da cefalosporina C, que foi adicionada para simular a presença de contaminantes no caldo que não podem ser quantificados.

6. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Neste trabalho foram avaliados processos de adsorção e troca iônica utilizando três adsorventes previamente selecionados. Tendo em vista os resultados obtidos, algumas sugestões são propostas para melhoria do processo em estudo:

- Estudos dos processos de microfiltração e ultrafiltração na purificação da cefamicina C e avaliação da possibilidade de retirada de uma destas etapas do processo sem causar prejuízos às etapas posteriores.
- Otimizar o processo de dessorção da cefamicina C na resina XAD4 em reator de mistura, com o intuito de recuperar a cefamicina C adsorvida na etapa de retirada de contaminantes do caldo ultrafiltrado.
- Identificação dos contaminantes majoritários presentes na fração obtida na coluna de troca iônica. Desta maneira, será possível concluir se a redução dos contaminantes observada por meio da análise de espectrometria de massas foi atingida no processo de troca iônica ou na etapa de adsorção no cartucho de fase estacionária C18.
- Seleção de outras resinas de troca aniônica com maior capacidade de adsorção da cefamicina C.
- Avaliação de outras resinas de interação hidrofóbica que proporcionem maiores diferenças de seletividade entre a cefamicina C e os contaminantes presentes.
- Estudar a adsorção em processos contínuos, como o leito móvel simulado, que proporciona maiores produtividades e melhores fatores de purificação.
- Estudo do processo de nanofiltração com o objetivo de concentrar a cefamicina C obtida nas frações das colunas com as resinas QXL, XAD4 e XAD16.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, R. M. R. G.; BARBOZA, M.; HOKKA, C. O. Continuous clavulanic acid adsorption process. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 108, p. 867-879, 2003.
- ASENJO, J. A.; ANDREWS, B. Challenges and trends in bioseparations. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 83, p. 117-120, 2008.
- BAGGALEY, K.H.; BROWN, A.G.; SCHOFIELD, C.J. Chemistry and biosynthesis of clavulanic acid and other clavams. **Natural Product Reports**, Surrey, v.14, p.309-333, 1997.
- BAILEY, J. E.; OLLIS, D. F. (a) Product Recovery Operations. In: ____ **Biochemical Engineering Fundamentals**. Nova Iorque: McGraw-Hill, 1986, p. 726-797.
- BAILEY, J. E.; OLLIS, D. F. (b) Applied Enzyme Catalysis. In: ____ **Biochemical Engineering Fundamentals**. Nova Iorque: McGraw-Hill, 1986, p. 157-227.
- BAPTISTA NETO, A.; OLIVEIRA, L.M.; BELLÃO, C.; BADINO, A.C.; BARBOZA, M.; HOKKA, C.O. An alternative methodology for determination of cephamycin C from fermentation broth. **Journal of Chromatography and Separation Techniques**, v. 3, N 130, 2012.
- BAPTISTA NETO, A.; BUSTAMANTE, M. C. C.; OLIVEIRA, J.H.H.L.; GRANATO, A. C.; BELLÃO, C.; BADINO, A. C.; BARBOZA, M.; HOKKA, C.O. Preliminary studies for cephamycin C purification technique. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 166, p. 208-221, 2012.
- BARBOZA, M.; ALMEIDA, R. M. R. G.; HOKKA, C. O. Intrinsic kinetic parameters of clavulanic acid adsorption by ion-exchange chromatography. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, v. 41, p. 5789-5793, 2002.
- BARBOZA, M.; HOKKA, C. O.; MAUGERI, F. Continuous cephalosporin C purification: dynamics modelling and parameter validation. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 25, p. 193-203, 2002.
- BARBOZA, M.; ALMEIDA, R. M. R. G.; HOKKA, C. O. Influence of the temperature on the kinetics of adsorption and desorption of clavulanic acid by ionic exchange. **Biochemical Engineering Journal**, v. 14, p. 19-26, 2003.
- BARROS, A. N. C. **Purificação de Penicilina G por adsorção em resinas hidrofóbicas**. 2008. 80f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2008.

- BARROS, M.A.S.D.; ZOLA, A. S.; ARROYO, P. A.; SOUSA-AGUIAR, E. F.; TAVARES, C.R.G. Binary ion exchange of metal ions in y and x zeolites. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 20, p. 413-421, 2003.
- BARTELL, F. E.; THOMAS, T. L.; FU, Y. Thermodynamics of adsorption from solution. VI Temperature dependence of adsorption. **The Journal of Physical Chemistry**, v.55, p. 1456-1462, 1951.
- BAUTISTA, L. F.; CASILLAS, J. L.; MARTNEZ, M.; ARACIL, J. Functionalized adsorbents for the purification of cephalosporin C and Deacetylcephalosporin C. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, Madri, v. 45, p. 3230-3236, 2006.
- BELLÃO, C.; ANTONIO, T.; ARAUJO, M. L. G. C.; BADINO, A. C. Production of clavulanic acid and cephamycin C by *Streptomyces clavuligerus* under different fed-batch conditions. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v.30, p. 257-266, 2013.
- BELTER, P.A.; CUSSLER, E.L.; HU, W.S. An overview of bioseparations, In: Bioseparations – Downstream Processing for Biotechnology. p.1-12, 368p. 1988. WileyInterscience Publication, Minneapolis.
- BORIN, B.; PAVKO, A. Adsorption of Vancomycin on Amberlite XAD16 in a packed bed column. **Chemical and Biochemical Engineering Quarterly**, v. 23, p. 479-483, 2009.
- BRAKHAGE, A.A.; AL-ABDALLAH, Q.; TÜNCHER, A.; SPRÖTE, P. Evolution of β -lactam biosynthesis genes and recruitment of trans -acting factors. **Phytochemistry**, Jena, v.66, 1200-1210, 2005.
- BUSTAMANTE, M.C.C.; OLIVEIRA, J.H.H.L.; MALPASS, A.C.G.; BATISTA-NETO, A.; BARBOSA, M.; HOKKA, C.O. Isolamento e purificação de cefamicina C produzida por *Streptomyces clavuligerus*. In: XVII Congresso de Engenharia Química, 2008, Recife, **Anais...** Recife: 2008.
- CHAUBAL, M.V.; PAYNE, G.F.; REYNOLDS, C.H.; ALBRIGHT, R.L. Equilibria for the adsorption of antibiotics onto neutral polymeric sorbents: experimental and modeling studies. **Biotechnology and Bioengineering**, Baltimore, v. 47, p. 215-226, 1995.
- ChemWeb.com. < <http://www.chemweb.com/content/databases>>. Acesso em 03/03/2013.
- COLLINS, C. H. Princípios básicos de cromatografia. In: COLLINS, C. A.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Introdução a métodos cromatográficos**. Campinas: UNICAMP, 1995. p. 11-27.
- CRAMER, S. M.; HOLSTEIN, M. A. Downstream bioprocessing: recent advances and future promises. **Current Opinion in Chemical Engineering**, v. 1, p. 27-37, 2011.

- CREN, E. C.; FILHO, L. C.; SILVA, E.A.; MEIRELLES, A. J. A. Breakthrough curves for oleic acid removal from ethanolic solutions using a strong anion exchange resin. **Separation and Purification Technology**, v. 69, p. 1-6, 2009.
- DATTA, C.; DUTTA, A.; DUTTA, D.; CHAUDHURI, S. Adsorption of polyphenols from ginger rhizomes on an anion exchange resin Amberlite IR – Study on effect of pH and temperature. In: International Congress on Engineering & Food, 11, 2011, Atenas. **Proceedings...** Elsevier, 2011. p. 893-899.
- DEMAIN, A. L.; ELANDER, R.P. The β -lactam antibiotics: past, present, and future. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 75, p. 5-19, 1999.
- DO, D. D. Fundamentals of Pure Component Adsorption Equilibria. In: _____. **Adsorption Analysis: Equilibria and Kinetics**. Londres: Imperial College Press, 1998. p. 11-48.
- DUTTA, M.; DUTTA, N. N.; BHATTACHARYA, K.G. Aqueous phase adsorption of certain beta-lactam antibiotics onto polymeric resins and activated carbon. **Separation and Purification Technology**, v. 16, p. 213-224, 1999.
- DUTTA, M.; BORAH, M.M.; DUTTA, N.N. Adsorptive separation of β -lactam antibiotics: technological perspectives. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, v. 86, p. 255-278, 2004.
- FARGUES, C.; LEWANDOWSKI, R.; LAMELOISE, M. Evaluation of ion-exchange and adsorbent resins for the detoxification of beet distillery effluents. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v.49, p. 9248-9257, 2010.
- FISHER, J., MAIKNER, J., GEHRIS, A. A new cost-effective adsorbent for the capture and purification of antibiotics. Advanced Biosciences – Rohm and Haas Company. Disponível em: <http://www.advancedbiosciences.com/Bioprocessing_doc/english/Amberlite%20XAD18%20Prep%202008.pdf>. Acesso em: 27 set 2011.
- FORTE, M. B. S.; RODRIGUES, M. I.; MAUGERI, F. Clavulanic acid adsorption studies in zeolites. **Adsorption Science & Technology**, v. 29, p. 391-403, 2011.
- GEANKOPLIS, C.J. Liquid-Liquid and Fluid-Solid Separation Processes. In: _____. **Transport Process and Unit Operations**. Cap. 12, p.697-743, Prentice-Hall Inc., New Jersey, 1993.
- GUBULIN, J. C. Transferência de Massa em Sistemas Particulados: Aspectos Gerais do Fenômeno de Adsorção. In: FREIRE, J. T.; GUBULIN, J. C. **Tópicos Especiais em Sistemas Particulados**. São Carlos: Universidade Federal de São Carlos, 1990, p. 203-291.
- HAMAD, B. The antibiotics market. **Nature Reviews Drug Discovery**, v.9, p.675-676, 2010.

-
- HARRISON, R.G.;TODD, P.; RUDGE, S.R.;PETRIDES, D.P. Introduction to Bioproducts and Bioseparation, In: Bioseparation Science and Engineering. p.1-42, Oxford University Press, 406 p., 2003. New York.
 - HARRISON, R.G.;TODD, P.; RUDGE, S.R.;PETRIDES, D.P. Liquid Chromatography and Adsorption, In: Bioseparations Science and Engineering. p.191-242, Oxford University Press, 406 p., 2003. New York.
 - HEKMATZADEH, A.; KARIMI-JASHANI, A.; TALEBBEYDOKHTI, N.; KLØVE, B. Modeling of nitrate removal for ion exchange resin in batch and fixed bed experiments. **Desalination**, v. 284, p. 22-31, 2012.
 - HICKETIER, M. ; BUCHHOLZ, K. Investigation on cephalosporin C kinetics and equilibria. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 32, p. 680-685, 1990.
 - HIGGENS, C.E.; HAMILL, R. L.; SANDS, T. H.; HOEHN, M. M.; DAVIS, N. E.; NAGARAJAN, R.; BOECK, L.D. The occurrence of deacetoxy-cephalosporin C in fungi and streptomycetes. **The Journal of Antibiotics**, Indianapolis, v. 27, p. 298-300, 1974.
 - KAGLIWAL, L. D.; SURVASE, S. A.; SINGHAL, R. S. A novel medium for the production of cephamycin C by *Nocardia lactamdurans* using solid-state fermentation. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 2600–2606, 2009.
 - KAMMERER, J.; CARLE, R.; KAMMERER, D. Adsorption and Ion Exchange: Basic Principles and Their Application in Food Processing. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, p. 22-42, 2011.
 - KAMOGASHIRA, T.; NISHIDA, T.; SUGAWARA, M.; NIHNO, T.; TAKEGATA, S. Process for the production of antibiotic cephamycin C. US Pat. 4.332.891, 1 jun. 1982. 10p.
 - KAWAMURA, M. Y.; SHOJI, H. J.; MATSUMOTO, T. K. Process for preparing cephamycin C. US Pat. 4.256.835, 17 mar. 1981. 4p.
 - KEIM, C.; LADISCH, M. R. Bioseparation of natural products. **Progress in Biotechnology**, v.16, p. 15-20, 2000.
 - KOTA, K. P.; SRIDHAR, P. Solid state cultivation of *Streptomyces clavuligerus* for cephamycin C production. **Process Biochemistry**, v. 34, p. 325–328, 1999.
 - KUNIN, R. The use of macroreticular polymeric adsorbents for the treatment of waste effluents. **Pure and Applied Chemistry**, v. 46, p. 205-211, 1976.
 - LEE, W. J.; PARK, H. C.; MOON, H. Adsorption and desorption of cephalosporin C on nonionic polymeric sorbents. **Separation and Purification Technology**, v. 12, p. 1-11, 1997.

- LEE, J. W.; JUNG, H. J.; MOON, H. Effect of operating conditions on adsorption of cephalosporin C in a column adsorber. **Korean Journal of Chemical Engineering**, v. 14, p. 277-284, 1997.
- LIRAS, P. Biosynthesis and molecular genetics of cephamycins. **Antonie van Leeuwenhoek**, Leon, v.75, p.109-124, 1999.
- LIRAS P.; MARTÍN J.F. Assay methods for detection and quantification of antimicrobial metabolites produced by *Streptomyces clavuligerus*. In: Barredo J. L., **Methods in Biotechnology**, vol. 18 (Microbial processes and products), cap. 7, p. 149, Humana Press Inc., Totowa, 2005.
- LIRAS,P.; MARTIN, J.F. Gene clusters for β -lactam antibiotics and control of their expression: why have clusters evolved, and from where did they originate? **International Microbiology**, Leon, v. 9, p. 9-19, 2006.
- LU, T. S.; LEE, T. Y. Separation of diethylbenzene isomers by column adsorption and desorption. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, v. 26, 2024-2028, 1987.
- MARTINS, R. M. **Avaliação de resinas de adsorção para aplicação em processo de purificação da cefamicina C**. São Carlos: UFSCar/Departamento de Engenharia Química, 2010. 37p. Relatório de Iniciação Científica.
- MILLER, T. W.; GOEGELMAN, R. T.; WESTON, R. G., PUTTER, I.; WOLF, F. J. Cephamycins, a new family of β -lactam antibiotics. II – Isolation and Chemical Characterization. **Antimicrobial and Agents Chemotherapy**, v. 2, p. 132-135, 1972.
- MUN, S. CHIN, C.; XIE, Y.; WANG, N. L. Standing wave design of carousel ion-exchange process for the removal of zinc ions from a protein mixture. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 45. P. 316-329, 2006.
- MURRAY, B. E.; MOELLERING, R. C. Cephalosporins. **Annual Review of Medicine**, v. 32, p. 559-581, 1981.
- OSTER, L.M.; LESTER, D.R.; SCHELTINGA, A.T.V.; SVENDA, M.; LUN, M.V.; GENEREUX, C.; ANDERSON, I. Insights into Cephamycin Biosynthesis: the Crystal Structure of Cmcl from *Streptomyces clavuligerus*. **Journal of Molecular Biology**, Uppsala e Liège, v. 358, p. 546-558, 2006.
- PINES; SEEMON. Antibiotic purification process. US Pat. 3.983.108, 28 set. 1976.4p.
- RAMOS, A.M., OTERO, M.; RODRIGUES, A.L. Recovery of Vitamin B12 and cephalosporin-C from aqueous solutions by adsorption on non-ionic polymeric adsorbents, **Separation and Purification Technology**, v. 38, p. 85-98, 2004.
- RIBEIRO, M. H. L.; RIBEIRO, I. A. C. Modelling the adsorption kinetics of erythromycin onto neutral and anionic resins. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 26, p. 49-55, 2003.

- RODRIGUEZ, G. Y.; HOKKA, C. O.; BARBOZA, M. Estudo da cinética e do equilíbrio do processo de purificação da cefamicina C em resina de troca iônica. In: Congresso Brasileiro de Engenharia Química, 18, 2010, Foz do Iguaçu. **Anais ...** 2010. p. 2640-2649. CD-ROM
- RODRIGUEZ, G. Y. **Estudo da cinética e do equilíbrio de adsorção da cefamicina C em resina de troca iônica e simulação do processo contínuo**. 2011. 70f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2011.
- ROLLINS, M. J.; JENSEN, S. E.; WESTLAKE, D. W. Effect of dissolved oxygen level on the ACV synthetase synthesis and activity during growth of *Streptomyces clavuligerus*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 35, p. 83-88, 1991.
- RUTHVEN, D. M. **Principles of adsorption and adsorption processes**. Nova Iorque: John Wiley & Sons, 1984, 433p.
- SAIKIA, M.D.; DUTTA, N.N. Adsorption affinity of certain biomolecules onto polymeric resins: Interpretation from molecular orbital theory. **Colloids and Surfaces A**, v. 280, p. 163-168, 2006.
- SAIKIA, M. D. Revisiting adsorption of biomolecules on polymeric resins. **Colloids and Surfaces**, v. 315, p. 196-204, 2008.
- SILVA, C. S. **Purificação do ácido clavulânico por processo de filtração tangencial, extração por sistema de duas fases aquosas e re-extração com resina de troca iônica**. 2010. 194f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2010.
- SCHUBERT, P. F. Antibiotic purification process. US Pat. 4.196.285, 1 abr. 1980. 3p.
- SCHWANKE, R. O. **Determinação da difusividade de hidrocarbonetos aromáticos em zeólitas Y por métodos cromatográficos**. 2003. 115f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2003.
- STAPLEY, E.O.; JACKSON, M.; HERNANDEZ, S.; ZIMMERMAN, S.B.; CURRIE, S.A.; MOCHALES, S.; MATA, J.M.; WOODDRUFF, H.B.; HENDLIN, D. Cephamycins, a new family of β -lactam antibiotics. I – Production by Actinomycetes, including *Streptomyces lactamdurans* sp. N. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 2, p.122-131, 1972.
- WEBER, W. J. Adsorption theory, concepts, and models. In: SLEJKO, F. L. **Adsorption technology: a step-by-step approach to process evaluation and application**. Nova Iorque: Marcel Dekker, 1985. p. 1-35.

- WEINBRENNER, W. F.; ETZEL, M. R. Competitive adsorption of α -lactalbumin and bovine serum albumin to a sulfopropyl ion-exchange membrane. **Journal of Chromatography A**, v. 662, p.414-419, 1994.
- WILDMAN, G.D.; DATTA, R. Isolation of antibiotic cephamycin C. US Pat. 4.137.405, 30 jan. 1979. 4p.