

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

**EXTRAÇÃO DE CEFAMICINA C POR SISTEMA DE  
DUAS FASES AQUOSAS E PURIFICAÇÃO POR  
TROCA IÔNICA**

Luciana Machado Brites

São Carlos – SP

2013

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

**EXTRAÇÃO DE CEFAMICINA C POR SISTEMA DE DUAS  
FASES AQUOSAS E PURIFICAÇÃO POR TROCA IÔNICA**

Luciana Machado Brites

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 Doutora 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**

B862ec

Brites, Luciana Machado.

Extração de cefamicina C por sistema de duas fases aquosas e purificação por troca iônica / Luciana Machado Brites. -- São Carlos : UFSCar, 2013.  
97 f.

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

1. Engenharia bioquímica. 2. Cefamicina C. 3. Troca iônica. 4. Sistema de duas fases aquosas. 5. Purificação de antibióticos. 6. Degradação. I. Título.

CDD: 660.63 (20<sup>a</sup>)

MEMBROS DA BANCA EXAMINADORA DA TESE DE DOUTORADO DE **LUCIANA MACHADO BRITES**, APRESENTADA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS EM 26 DE ABRIL DE 2013.

BANCA EXAMINADORA:



Marlei Barboza Pasotto  
**Orientador / UFSCar**



Susana Juliano Kalil  
**FURG**



Eliana Setsuko Kamimura  
**USP**



Daniela Battaglia Hirata  
**UNIFAL**



Clóvis Sacardo da Silva  
**ALCOA**

*Este trabalho é dedicado a Deus. À minha mãe Giza, por todo o apoio, incentivo e carinho durante toda esta etapa tão importante em minha vida. Ao meu marido Vinícius, pelo amor, amizade e paciência, e que desde o início esteve sempre ao meu lado me incentivando e apoiando.*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus por todas as realizações que me foram proporcionadas ao longo de minha vida.

Um agradecimento especial ao Professor Dr. Marlei Barboza por ter me dado a oportunidade de vivenciar essa experiência, por me proporcionar uma melhor qualificação profissional e, conseqüentemente, melhores perspectivas profissionais.

À colega Liliane pela amizade e companheirismo durante toda a realização deste trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Engenharia Bioquímica: Cecília, Guilherme, Carolina, Sérgio, Cláudia e Maritza pelo companheirismo e amizade.

Ao técnico Amadeus que esteve sempre disposto a ajudar e pela amizade.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPQ pela bolsa concedida.

Enfim a todos que contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

*“Para realizar grandes conquistas, devemos não apenas agir, mas também sonhar; não apenas planejar, mas também acreditar”*

*Anatole France*

## RESUMO

A cefamicina C (cef C) é um antibiótico  $\beta$ -lactâmico que pertence à classe das cefalosporinas. Este antibiótico se destaca das demais cefalosporinas por possuir atividade frente a bactérias gram-negativas e ser resistente à ação das  $\beta$ -lactamases, produzidas por micro-organismos patogênicos, e que representam um dos principais mecanismos de resistência bacteriana aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos. Tendo em vista as restritas informações na literatura sobre as etapas do processo, tanto sob o ponto de vista de pesquisa e industrial de produção da cefamicina C, torna-se de grande importância o estudo de sua produção e conseqüentemente do processo de separação e purificação. Portanto, o objetivo principal deste trabalho foi desenvolver um processo de separação e purificação da cefamicina C, a partir de um caldo fermentado produzido por cultivos da bactéria *Streptomyces clavuligerus*, em processos submersos aerados. Os processos de extração e separação da cefamicina C foram realizados por meio de sistema de duas fases aquosas (S DFA) e cromatografia de troca iônica em coluna de leito fixo, respectivamente. Inicialmente, foram realizados estudos de estabilidade da cefamicina C, tendo em vista permitir o estabelecimento de condições que minimizem as perdas e aumentem o rendimento do processo global. Nestes estudos foram avaliadas as condições em pH de 2,2, 3,3, 5,0, 6,0; 7,0; 7,6 e 8,7 a uma temperatura de 20 °C. A meia-vida para o pH 8,7 foi de 52,6 horas, para o pH 6,0 a meia-vida foi de 459 horas e, para o pH mais ácido (2,2), a meia-vida foi de 118,6 horas. A segunda etapa do trabalho correspondeu ao estudo da separação entre a cefamicina C e os aminoácidos, por meio do sistema de duas fases aquosas composto por polietileno glicol (PEG) /fosfato. A presença dos aminoácidos ornitina, lisina e asparagina no caldo fermentado, mesmo após as etapas de separação primária, realizada por processos de filtração compostos por microfiltração e ultrafiltração, devem-se a composição do meio de cultura de origem complexa. Os experimentos foram realizados variando-se os seguintes parâmetros: massa molecular de PEG (400, 600, 1000 e 4000), pH (6, 7 e 8), tamanho de *tie-line* (TLL – 37 e 43) e razão de volume das fases (rTLL – 0,75, 1,00 e 1,25), de modo a possibilitar a determinação do melhor sistema para a extração da cefamicina C. As melhores condições obtidas para este processo foram pH 8, PEG 400, TLL 43 e rTLL 1,00, onde se obteve o maior coeficiente de partição,  $k_p$  de 5,57. Para as separações entre a cef C e os aminoácidos presentes no caldo foi possível verificar as seguintes eficiências de separação: 3,4 (ornitina), 6,9 (lisina) e 2,8 (asparagina). Na etapa final do trabalho foi possível recuperar a cef C da fase PEG, promovendo ainda uma maior purificação com os aminoácidos residuais. Para tal proposta, utilizou-se a técnica cromatográfica de troca iônica, com utilização da resina aniônica Amberlite IRA 400. Estes experimentos foram realizados sob temperaturas de 20, 25 e 30 °C e pH 2,8 e 6,8. A resina Amberlite IRA 400 mostrou afinidade em relação à cef C, e nos experimentos em coluna de leito fixo, foi possível separar a cef C do PEG, do sal de fosfato e dos aminoácidos presentes na fase de topo. Os resultados obtidos permitiram concluir, que o processo proposto mostrou-se viável para a extração e separação da cefamicina C.

## ABSTRACT

Cephamicin C is a  $\beta$ -lactam antibiotic that belongs to the cephalosporins. This antibiotic stands out from other cephalosporins because it has activity against gram-negative bacteria and for being resistant to  $\beta$ -lactamases produced by pathogenic microorganisms, and which represent one of the major mechanisms of bacterial resistance to  $\beta$ -lactam antibiotics. In view of the restricted information in the literature about the steps of the process, both from the point of view of research and of industrial production of cephamicin C, the study about its production and, consequently, the process of separation and purification becomes of great importance. Therefore, the main objective of this work was to develop a separation and purification process of cephamicin C from a fermentation broth produced by cultivations of *Streptomyces clavuligerus* in airtight submerged processes. Extraction and separation processes of cephamicin C were performed by means of an aqueous two-phase system (ATPS) and ion-exchange chromatography, respectively. Initially, studies on the stability of cephamicin C were performed in order to allow the establishment of conditions which minimize losses and increase the yield of the global process. In these studies, conditions at pH levels of 2.2, 3.0, 5.0, 6.0, 7.0, 7.6 and 8.7 at a temperature of 20 °C were evaluated. The smallest half-life was of 52.6 hours and was verified for pH 8.7; the longest half-life was of 459 hours for pH 6.0; and for the most acid pH (2.2), half-life was of 118.2 hours. The second step of the work was the study of the separation of cephamicin C and amino acids with the aqueous two-phase system composed by PEG/phosphate. The presence of ornithine, lysine and asparagine amino acids in the fermentation broth, even after the primary separation steps performed by filtration processes consisting of microfiltration and ultrafiltration, is due to the composition of the culture medium which is of complex origin. The experiments were carried out by varying the following parameters: molecular mass of PEG (400, 600, 1000 and 4000), pH (6, 7 and 8), tie-line length (TLL – 37 and 43) and phase volume ratio (rTLL – 0.75, 1.00 and 1.25), in order to enable the determination of the best system for cephamicin C extraction. The best conditions obtained for this process were pH 8, PEG 400, TLL 43 and rTLL 1.00, where the highest partition coefficient,  $k_p$  of 5.57, was acquired. For the separations of cephamicin C and the amino acids present in the broth, it was possible to verify the following separation efficiencies: 3.4 (ornithine), 6.9 (lysine) and 2.8 (asparagine). The last step of the work showed that it is possible to recover cephamicin C from the PEG phase promoting an even greater purification with the residual amino acids. The ion-exchange chromatography was used to propose so. For this proposal, we used the ion exchange chromatographic technique, with use of anionic resin Amberlite IRA 400. These experiments were performed under temperatures of 20, 25 and 30 °C and pH 2.8 and 6.8. The Amberlite IRA 400 Cl<sup>-</sup> resin showed affinity for cephamicin C, and in the experiments in fixed bed column, it was possible to separate cephamicin C from PEG, from the phosphate salt and from the amino acids present in the top phase. The results allowed the conclusion that the proposed process is an excellent alternative for the extraction, separation and purification of cephamicin C.

# LISTA DE FIGURAS

## CAPÍTULO 2

FIGURA 2.1 - DIVISÃO DOS GRUPOS DE ANTIBIÓTICOS B-LACTÂMICOS. ....	5
FIGURA 2.2 - ESTRUTURA DOS ANTIBIÓTICOS B-LACTÂMICOS INIBIDORES DE B-LACTAMASE. ....	8
FIGURA 2.3 - ESTRUTURA MOLECULAR DA CEFAMICINA C. ....	8
FIGURA 2.4 - ESTRUTURA MOLECULAR DAS CEFAMICINAS A, B E C. ....	9
FIGURA 2.5 - ESTRUTURA MOLECULAR DO CEFOXITIN. ....	10
FIGURA 2.6 – EXEMPLO GENÉRICO DE UM DIAGRAMA DE FASES E LINHA DE AMARRAÇÃO (PEG/FOSFATO). ....	12
FIGURA 2.7 - PURIFICAÇÃO DA CEFAMICINA C: PROCESSO COM CARVÃO ATIVADO E TROCA IÔNICA. ....	20
FIGURA 2.8 - PURIFICAÇÃO DA CEFAMICINA C: PROCESSO COM RECICLO E RESINA CATIONICA. ....	21
FIGURA 2.9 - CADEIA PRODUTIVA FARMACÊUTICA: COMPARAÇÃO ENTRE IMPORTAÇÕES E EXPORTAÇÕES DE MEDICAMENTOS E DE INSUMOS FARMACÊUTICOS EM (US\$ MILHÕES) ENTRE 2008 E 2012. ....	23

## CAPÍTULO 3

FIGURA 3.1 – DIFERENÇA DE TURBIDEZ DO CALDO FERMENTADO CONTENDO CEFAMICINA C, APÓS OS PROCESSOS DE MICROFILTRAÇÃO (1) E ULTRAFILTRAÇÃO (2). ....	37
FIGURA 3.2 – CURVAS CINÉTICAS DE DEGRADAÇÃO DA CEFAMICINA C EM FUNÇÃO DO TEMPO, PARA OS DIFERENTES PHs (2,2; 3,3, 5,0, 6,0; 7,0; 7,6 e 8,7). ....	38
FIGURA 3.3 - AJUSTE DOS DADOS EXPERIMENTAIS DO PROCESSO DE DEGRADAÇÃO DA CEFAMICINA C AO MODELO DE CINÉTICA DE DEGRADAÇÃO DE PRIMEIRA ORDEM PARA PH 2,2. ....	39
FIGURA 3.4 - AJUSTE DOS DADOS EXPERIMENTAIS DO PROCESSO DE DEGRADAÇÃO DA CEFAMICINA C AO MODELO DE CINÉTICA DE DEGRADAÇÃO DE PRIMEIRA ORDEM PARA PH 3,3. ....	39
FIGURA 3.5 - AJUSTE DOS DADOS EXPERIMENTAIS DO PROCESSO DE DEGRADAÇÃO DA CEFAMICINA C AO MODELO DE CINÉTICA DE DEGRADAÇÃO DE PRIMEIRA ORDEM PARA PH 5,0. ....	40
FIGURA 3.6 - AJUSTE DOS DADOS EXPERIMENTAIS DO PROCESSO DE DEGRADAÇÃO DA CEFAMICINA C AO MODELO DE CINÉTICA DE DEGRADAÇÃO DE PRIMEIRA ORDEM PARA PH 6,0. ....	40
FIGURA 3.7 - AJUSTE DOS DADOS EXPERIMENTAIS DO PROCESSO DE DEGRADAÇÃO DA CEFAMICINA C AO MODELO DE CINÉTICA DE DEGRADAÇÃO DE PRIMEIRA ORDEM PARA PH 7,0. ....	41
FIGURA 3.8 - AJUSTE DOS DADOS EXPERIMENTAIS DO PROCESSO DE DEGRADAÇÃO DA CEFAMICINA C AO MODELO DE CINÉTICA DE DEGRADAÇÃO DE PRIMEIRA ORDEM PARA PH 7,6. ....	41
FIGURA 3.9 - AJUSTE DOS DADOS EXPERIMENTAIS DO PROCESSO DE DEGRADAÇÃO DA CEFAMICINA C AO MODELO DE CINÉTICA DE DEGRADAÇÃO DE PRIMEIRA ORDEM PARA PH 8,7. ....	42
FIGURA 3.10 - CONSTANTES GLOBAIS DE HIDRÓLISE DA CEFAMICINA C EM FUNÇÃO DO PH, A 20 °C. ....	44

## CAPÍTULO 4

FIGURA 4.1 – AMINOGRAMA DO CALDO DE FERMENTAÇÃO CONTENDO CEFAMICINA C. ....	52
FIGURA 4.2 - EXEMPLO DE UM DIAGRAMA DE FASES E LINHA DE AMARRAÇÃO. ....	54
FIGURA 4.3- ESQUEMA DO APARATO EXPERIMENTAL UTILIZADO NA EXTRAÇÃO POR SDFA. ....	56
FIGURA 4.4 - CURVA BINODAL COM PEG 400. ....	57
FIGURA 4.5 - CURVA BINODAL COM PEG 600. ....	57
FIGURA 4.6 - CURVA BINODAL COM PEG 1000. ....	58
FIGURA 4.7 - CURVA BINODAL COM PEG 4000. ....	58
FIGURA 4.8 - COEFICIENTE DE PARTIÇÃO DA CEF C, EM FUNÇÃO DA RTLL (PEG 400 E TLL 37). ....	60
FIGURA 4.9 - COEFICIENTE DE PARTIÇÃO DA CEF C, EM FUNÇÃO DA RTLL (PEG 400 E TLL 43). ....	60
FIGURA 4.10 - COEFICIENTE DE PARTIÇÃO DA CEF C, EM FUNÇÃO DA RTLL (PEG 600 E TLL 37). ....	61
FIGURA 4.11 - COEFICIENTE DE PARTIÇÃO DA CEF C, EM FUNÇÃO DA RTLL (PEG 600 E TLL 43). ....	61
FIGURA 4.12 - COEFICIENTE DE PARTIÇÃO DA CEF C, EM FUNÇÃO DA RTLL (PEG1000 E TLL 37). ....	62
FIGURA 4.13 - COEFICIENTE DE PARTIÇÃO DA CEF C, EM FUNÇÃO DA RTLL (PEG 1000 E TLL 43). ....	62
FIGURA 4.14 - COEFICIENTE DE PARTIÇÃO DA CEF C, EM FUNÇÃO DA RTLL (PEG4000 E TLL 37). ....	63
FIGURA 4.15 - COEFICIENTE DE PARTIÇÃO DA CEF C, EM FUNÇÃO DA RTLL (PEG 4000 E TLL 43). ....	63
FIGURA 4.16 - COEFICIENTE DE PARTIÇÃO DA CEF C E AMINOÁCIDOS EM FUNÇÃO DA RTLL ( $C_0$ AMINOÁCIDOS - 20 MM). ....	65
FIGURA 4.17 - COEFICIENTE DE PARTIÇÃO DA CEF C E AMINOÁCIDOS EM FUNÇÃO DA RTLL ( $C_0$ AMINOÁCIDOS - 166 MM).....	66

## CAPÍTULO 5

FIGURA 5.1 - APARATO EXPERIMENTAL UTILIZADO NAS CINÉTICAS DE ADSORÇÃO E DESSORÇÃO DA CEF C. ....	76
FIGURA 5.2 – ESQUEMA DO PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL DE EXTRAÇÃO POR SDFA. ....	77
FIGURA 5.3 - ESQUEMA DO PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL EM COLUNA DE LEITO FIXO. ....	78
FIGURA 5.4 - CURVAS CINÉTICAS DE ADSORÇÃO DA CEFAMICINA C NA SOLUÇÃO DE FASE DE TOPO (PH 8) NAS TEMPERATURAS DE 10, 20 E 25 °C). ....	83
FIGURA 5.5 - CURVAS CINÉTICAS DE DESSORÇÃO DA CEFAMICINA C NA SOLUÇÃO DE FASE DE TOPO (PH 8) NAS TEMPERATURAS DE 10, 20 E 25 °C). ....	83
FIGURA 5.6 – QUANTIDADE DE CEFAMICINA C ADSORVIDA POR MASSA DE RESINA EM FUNÇÃO DO TEMPO, NA SOLUÇÃO DE FASE DE TOPO (PH 8) NAS TEMPERATURAS DE 10, 20 E 25 °C. ....	83
FIGURA 5.7 - ISOTERMA DE EQUILÍBRIO DE ADSORÇÃO DA CEF C A 25° C, SOLUÇÃO DE FASE DE TOPO (PH 8), NA RESINA AMBERLITE IRA-400 CL. ....	85
FIGURA 5.8 - PERFIL DE ADSORÇÃO E DESSORÇÃO DA CEF C E PEG EM COLUNA DE LEITO FIXO (ELUIÇÃO LINEAR). ....	87
FIGURA 5.9 - PERFIL DE ADSORÇÃO E DESSORÇÃO DA CEF C E PEG EM COLUNA DE LEITO FIXO (ELUIÇÃO DEGRAU). ....	87
FIGURA 5.10 - PERFIL DE ADSORÇÃO E DESSORÇÃO DA CEF C E FOSFATO EM COLUNA DE LEITO FIXO. ....	88
FIGURA 5.11 - PERFIL DE ADSORÇÃO E DESSORÇÃO DA CEF C E LISINA EM COLUNA DE LEITO FIXO. ....	89
FIGURA 5.12 - PERFIL DE ADSORÇÃO E DESSORÇÃO DA CEF C E ORNITINA EM COLUNA DE LEITO FIXO. ....	90
FIGURA 5.13 - PERFIL DE ADSORÇÃO E DESSORÇÃO DA CEF C E ASPARAGINA EM COLUNA DE LEITO FIXO. ....	90

# LISTA DE TABELAS

## CAPÍTULO 2

TABELA 2.1 - ANTIBIÓTICOS B-LACTÂMICOS COMERCIALIZADOS. ....	6
TABELA 2.2 - VALORES DE CONSTANTE DE AFINIDADE E MÁXIMA CAPACIDADE DE ADSORÇÃO PARA A CEFALOSPORINA C.....	18
TABELA 2.3 - OS 10 PRINCIPAIS PRODUTOS EXPORTADOS PELO BRASIL ENTRE OS ANOS DE 2010 E 2012 EM US\$ (MILHÕES).....	25
TABELA 2.4 - OS 10 PRINCIPAIS PRODUTOS IMPORTADOS PELO BRASIL ENTRE OS ANOS DE 2010 E 2012 EM US\$ (MILHÕES). ....	25

## CAPÍTULO 3

TABELA 3.1 – SOLUÇÕES TAMPÃO A DIFERENTES VALORES DE PHS UTILIZADAS NOS EXPERIMENTOS DE HIDRÓLISE DA CEFAMICINA C	36
TABELA 3.2 - VALORES DAS CONSTANTES CINÉTICAS DE HIDRÓLISE ( $k_H$ ) E MEIA VIDA PARA A CEFAMICINA C, EM SOLUÇÕES AQUOSAS A 20 °C. ....	42
TABELA 3.3 - VALORES DAS CONSTATES PARCIAIS DE HIDRÓLISE DA CEF C, CEFALOSPORINA C E ÁCIDO CLAVULÂNICO EM SOLUÇÃO AQUOSA. ....	44

## CAPÍTULO 4

TABELA 4.1 – COMPOSIÇÕES DOS SISTEMAS DE PEG E FOSFATO EM FUNÇÃO DA RAZÃO DE VOLUME ENTRE AS FASES DE TOPO E FUNDO (RTLL) E TAMANHO DE TIE-LINE (TLL) .....	59
TABELA 4.2 - COEFICIENTE DE PARTIÇÃO DA CEFAMICINA C NO SISTEMA (PEG 400, PH 8 E TLL 43), EM FUNÇÃO DA RTLL, NO CALDO SEM ADIÇÃO DE AMINOÁCIDOS E COM ADIÇÃO DE 20 mM E 166 mM DOS AMINOÁCIDOS ORNITINA, LISINA E ASPARAGINA	67
TABELA 4.3 - EFICIÊNCIA DE SEPARAÇÃO (ES), FATOR DE PURIFICAÇÃO (FP) E FATOR DE CONCENTRAÇÃO (FC) DA CEFAMICINA C EM FUNÇÃO DA RTLL ( $C_0$ AMINOÁCIDOS - 20 MM E 166 MM).....	67

## CAPÍTULO 5

TABELA 5.1 - PARÂMETROS OPERACIONAIS DOS ENSAIOS REALIZADOS EM COLUNA DE LEITO FIXO. ....	79
TABELA 5.2 - RESULTADOS OBTIDOS DE FP, $C_{EQ}$ , E $Q_{EQ}$ PARA AS CINÉTICAS DE ADSORÇÃO E DESSORÇÃO PARA A CEFAMICINA C, EM PH 2,8 E 6,8 E TEMPERATURAS DE 20, 25 E 30 °C PARA RESINA AMBERLITE IRA 400.....	80
TABELA 5.3 - RESULTADOS OBTIDOS DE FP, $C_{EQ}$ , E $Q_{EQ}$ PARA AS CINÉTICAS DE ADSORÇÃO E DESSORÇÃO PARA A CEFAMICINA C, EM PH 2,8 E 6,8 E TEMPERATURAS DE 20, 25 E 30 °C PARA RESINA STREAMLINE DEAE.....	80

TABELA 5.4 - RESULTADOS OBTIDOS DE FP, $C_{eq}$ , E $Q_{eq}$ PARA AS CINÉTICAS DE ADSORÇÃO E DESSORÇÃO PARA A CEFAMICINA C, EM PH 2,8 E 6,8 E TEMPERATURAS DE 20, 25 E 30 °C PARA RESINA STREAMLINE Q XL.....	81
TABELA 5.5 - PARÂMETROS DA ISOTERMA DE LANGMUIR E DE FREUNDLICH DETERMINADOS POR REGRESSÃO LINEAR NA FASE DE TOPO (PH 8,0) A 25 °C, EM RESINA IRA 400 CL.....	85
TABELA 5.6- FATOR DE PURIFICAÇÃO (FP) DA CEF C EM RELAÇÃO AO FOSFATO E AOS AMINOÁCIDOS (ASPARAGINA, ORNITINA E LISINA) EM COLUNA DE LEITO FIXO.....	91

# SUMÁRIO

RESUMO .....	VI
ABSTRACT .....	VII
LISTA DE FIGURAS .....	VIII
LISTA DE TABELAS .....	X
CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO E OBJETIVOS	
1.1 INTRODUÇÃO .....	1
1.2 OBJETIVOS .....	2
CAPÍTULO 2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	
2.1 ANTIBIÓTICOS B-LACTÂMICOS.....	5
2.1.1 PENICILINAS.....	5
2.1.2 CEFALOSPORINAS.....	6
2.1.3 CARBAPENS.....	7
2.1.4 MONOBACTANS.....	7
2.1.5 CLAVANS (INIBIDORES DE B-LACTAMASES).....	7
2.1.6 CEFAMICINA C.....	8
2.2 EXTRAÇÃO DE PRODUTOS BIOTECNOLÓGICOS POR SISTEMA DE DUAS FASES AQUOSAS (SDFA).....	11
2.3 CROMATOGRAFIA.....	15
A ) CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO MOLECULAR.....	16
B) CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE.....	16
C) CROMATOGRAFIA DE INTERAÇÃO HIDROFÓBICA.....	16
D) CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA.....	17
2.4 PURIFICAÇÃO DE PRODUTOS BIOTECNOLÓGICOS POR CROMATOGRAFIA.....	17
2.5 PROCESSOS DE SEPARAÇÃO E PURIFICAÇÃO DA CEFAMICINA C.....	20
2.6 SITUAÇÃO ATUAL DO MERCADO NACIONAL DE MEDICAMENTOS.....	23
2.7 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	26
2.8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	26
CAPÍTULO 3 – ESTUDO CINÉTICO DA DEGRADAÇÃO DA CEFAMICINA C	
RESUMO.....	33
3.1 INTRODUÇÃO.....	34
3.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	35
3.2.1 TRATAMENTO DO CALDO FERMENTADO.....	35

3.2.2 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DA CEFAMICINA C.....	35
3.3 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	35
3.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	36
3.5 CONCLUSÃO.....	45
3.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	46
CAPÍTULO 4 – SEPARAÇÃO DA CEFAMICINA C DE AMINOÁCIDOS POR SISTEMA DE DUAS FASES AQUOSAS	
RESUMO.....	49
4.1 INTRODUÇÃO.....	50
4.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	51
4.2.1 TRATAMENTO DO CALDO FERMENTADO.....	51
4.2.2 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE CEFAMICINA C.....	52
4.2.3 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE AMINOÁCIDOS.....	52
4.2.4 DETERMINAÇÃO DAS LINHAS DE AMARRAÇÃO EM RAZÃO DE VOLUME DE FASES.....	53
4.2.5 DETERMINAÇÃO DO COEFICIENTE DE PARTIÇÃO (KP), FATOR DE PURIFICAÇÃO (FP), EFICIÊNCIA DE SEPARAÇÃO (ES) E FATOR DE CONCENTRAÇÃO (FC).....	54
4.3 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	55
4.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	56
4.5 CONCLUSÃO.....	68
4.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	68
CAPÍTULO 5 – RECUPERAÇÃO DA CEFAMICINA C ABSORVIDA NA FASE PEG, UTILIZANDO CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA	
RESUMO.....	70
5.1 INTRODUÇÃO.....	71
5.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	73
5.2.1 TRATAMENTO DO CALDO FERMENTADO.....	73
5.2.2 RESINA DE TROCA IÔNICA.....	73
5.2.3 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE CEFAMICINA C.....	74
5.2.4 DETERMINAÇÃO DOS CONTAMINANTES.....	74
5.2.5 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE PEG.....	74
5.2.6 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE FÓSFORO.....	74
5.2.7 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DOS AMINOÁCIDOS.....	75
5.3 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	75
5.3.1 CINÉTICAS DE ADSORÇÃO E DESSORÇÃO.....	75

5.3.2 DETERMINAÇÃO DAS ISOTERMAS.....	76
5.3.3 TRATAMENTO DA RESINA.....	76
5.3.4 EXTRAÇÃO POR SISTEMA DE DUAS FASES AQUOSAS.....	77
5.3.5 RECUPERAÇÃO POR TROCA IÔNICA EM COLUNA DE LEITO FIXO.....	78
5.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	80
5.4.1 CINÉTICAS DE ADSORÇÃO E DESSORÇÃO DO CALDO FERMENTADO.....	80
5.4.2 CINÉTICAS DE ADSORÇÃO E DESSORÇÃO DA SOLUÇÃO DE FASE DE TOPO (PEG 400).....	81
5.4.3 ISOTERMA DE ADSORÇÃO NA SOLUÇÃO DE FASE DE TOPO (PEG 400).....	84
5.4.4 RECUPERAÇÃO DA CEFAMICINA C DO PEG 400 POR TROCA IÔNICA EM COLUNA DE LEITO FIXO.....	86
5.5 CONCLUSÃO.....	91
5.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	92
CAPÍTULO 6 – CONCLUSÕES GERAIS.....	96

## DESCRIÇÃO DOS CAPÍTULOS

### **Capítulo 1.** Introdução Geral e Objetivos

### **Capítulo 2.** Revisão Bibliográfica

Este capítulo aborda uma revisão bibliográfica, no qual são apresentados trabalhos existentes na literatura acerca do assunto abordado, que se mostram relevantes diante do tema proposto para a presente pesquisa.

### **Capítulo 3.** Estudo cinético da degradação da cefamicina C.

O conhecimento da estabilidade da cefamicina C é de grande importância para a realização deste trabalho, pois visa determinar as condições em que a cefamicina C apresenta-se com maior estabilidade e, conseqüentemente, o meio mais adequado para desenvolver o processo proposto neste trabalho.

**Capítulo 4.** Separação da cefamicina C de aminoácidos por sistema de duas fases aquosas.

Neste capítulo, inicialmente, foi determinado o melhor sistema a ser utilizado para promover a separação da cef C do caldo fermentado, avaliando diferentes parâmetros, como: massa molecular de PEG, pH, tamanho de *tie-line* (TLL) e razão de volume entre as fases topo e fundo (rTLL). Na etapa posterior deste capítulo, foi realizada a separação da cef C, em relação aos aminoácidos presentes no caldo fermentado, utilizando-se o melhor sistema definido anteriormente.

**Capítulo 5.** Recuperação da cefamicina C absorvida na fase PEG por meio de cromatografia de troca iônica.

Este capítulo trata da separação da cef C do caldo fermentado, através de processos de extração líquido-líquido utilizando o SDFA (PEG/fosfato), seguido de cromatografia de troca iônica como uma etapa de recuperação, e purificação do antibiótico presente na fase de topo (PEG).

## **Capítulo 6. Conclusões Gerais**

Apresenta-se as principais conclusões obtidas a partir dos resultados de cada etapa constituinte do processo de separação e purificação da cefamicina C, proposta neste trabalho.

# CAPÍTULO 1

**Introdução e  
Objetivos**

## 1.1 INTRODUÇÃO

Na década de 1970, dada a preocupação com o crescente aumento da resistência bacteriana a antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, duas grandes frentes de pesquisa foram organizadas, uma na busca de novos compostos antibióticos resistentes às  $\beta$ -lactamases, e a segunda na descoberta de substâncias inibidoras de  $\beta$ -lactamases, para serem administradas em conjunto com antibióticos  $\beta$ -lactâmicos. Como resultado da primeira frente de pesquisa, foi descoberta a cefamicina C ou 7-alfa metoxi-cefalosporina C, de culturas de *Streptomyces sp.*, pelas indústrias Merck e Eli Lilly. A descoberta da cefamicina C representou um marco no desenvolvimento dos antibióticos. Pela primeira vez, uma molécula com atividade antibacteriana mostrou-se resistente às  $\beta$ -lactamases de bactérias Gram-negativas. A cefamicina C não é utilizada clinicamente, porém é a molécula precursora de vários antibióticos de importância terapêutica, chamados de cefâmicos (ELANDER, 2003).

As  $\beta$ -lactamases são enzimas produzidas por bactérias e que clivam o anel  $\beta$ -lactâmico do antibiótico, liberando um composto sem atividade. Estudos de Baggaley, Brown e Schofield (1997), mostraram que a cefamicina C apresenta maior estabilidade à ação das  $\beta$ -lactamases, quando comparada com a cefalosporina C.

A cefamicina C (cef C) é utilizada como matéria-prima para a produção de antibióticos semi-sintéticos, como por exemplo, a cefoxitina e cefotetan, que são altamente ativos contra bactérias gram-negativas e gram-positivas. O mercado farmacêutico apresenta uma elevada demanda destes derivados da cef C, uma vez que são amplamente utilizados em terapia humana, devido ao seu amplo espectro de atividade bacteriana (SHIDHAR, 2002).

Dados obtidos na Associação Brasileira da Indústria Farmoquímica (Abiquif), demonstram o crescimento do Brasil em relação à exportação de medicamentos. Dentre os 10 principais produtos exportados, entre os anos de 2010 e 2012, destacam-se os medicamentos pertencentes à classe das cefalosporinas, que dobraram a comercialização neste período, alcançando valores da ordem de US\$ 10,0 milhões (Abiquif, 2013).

Na literatura são encontrados alguns trabalhos acerca da produção de cef C, a partir de diferentes micro-organismos e escalas de produção (Park et al., 1994, Dévi e Sridhar, 1999, Kamogashira et al., 1982, Antônio, 2007, dentre outros). Bellão (2010) estudou a produção da cefamicina C, a partir de *Streptomyces clavuligerus* DSM 41826, cultivado em batelada alimentada, com o meio à base de farinha de soja e lisina como fonte de nitrogênio, e glicerol

como fonte de carbono. O melhor resultado em termos de produção de cefamicina C foi de 566,5 mg.L<sup>-1</sup> em 108 horas de cultivo.

Devido à importância deste antibiótico, no aspecto clínico e comercial, é de fundamental importância a realização de estudos sobre o seu processo de produção, separação e purificação. Na literatura, há poucos artigos recentes sobre o processo de separação e purificação da cefamicina C, como por exemplo, os trabalhos de Baptista et al. (2012a e 2012b). Os autores realizaram o estudo da purificação da cef C produzida pelo micro-organismo *Streptomyces clavuligerus*, a partir do caldo fermentado por adsorção não-específica e cromatografia de troca iônica e propuseram uma metodologia de análise da cef C, por cromatografia líquida de alto desempenho (CLAE).

Existem algumas patentes a respeito do processo de separação da cefamicina C, porém os procedimentos são descritos de forma superficial, como por exemplo: Pines (1973), Kamogashira et al. (1982) e Schubert (1980).

Buscando contribuir com o desenvolvimento do processo global de obtenção de cefamicina C, no presente trabalho visou propor e estudar etapas para o desenvolvimento do processo de separação e purificação da cefamicina C, definidos na seguinte sequência de operações: (a) filtração do caldo para remoção de células e seus fragmentos do meio de cultivo; (b) extração da cef C do caldo filtrado por um sistema de duas fases aquosas (SDFA) e; (c) recuperação e purificação seletiva, por meio de processo de adsorção de troca iônica.

## 1.2 OBJETIVOS

O objetivo geral do presente trabalho foi estudar e avaliar a extração e separação da cefamicina C, através dos processos de extração, utilizando-se os sistemas de duas fases aquosas (SDFA) compostos por polietileno glicol (PEG) e sal de fosfato e recuperação da fase PEG, promovendo a purificação, por adsorção de troca iônica.

Para alcançar o objetivo geral proposto, foram cumpridos os seguintes objetivos específicos:

- a) Estudo da estabilidade da cef C, para diferentes valores de pH (2,2; 3,3; 5,0; 6,0; 7,0; 7,6 e 8,7), sob temperatura de 20 °C;

- b) Estudos da extração da cef C por extração em SDFA, buscando avaliar os parâmetros:
- Massas moleculares: foram utilizados polietilenoglicol (PEG) de massas moleculares: 400, 600, 1000 e 4000 (g/mol);
  - Efeito do pH: os estudos foram conduzidos nos valores de potencial hidrogeniônico de 6,0, 7,0 e 8,0;
  - Tamanho das linhas de amarração ou “*tie-line*” (TLL): 37 e 43;
  - Diferentes razões de volume de topo e fundo (rTLL): 0,75, 1,00 e 1,25;
- c) Estudo da separação da cef C dos aminoácidos presentes no caldo, com utilização de SDFA, com o melhor sistema definido na etapa anterior;
- d) Estudo da recuperação da cef C da fase PEG por cromatografia de troca iônica. A resina utilizada nos estudos foi a Amberlite IRA-400 <sup>-</sup>Cl.

# CAPÍTULO 2

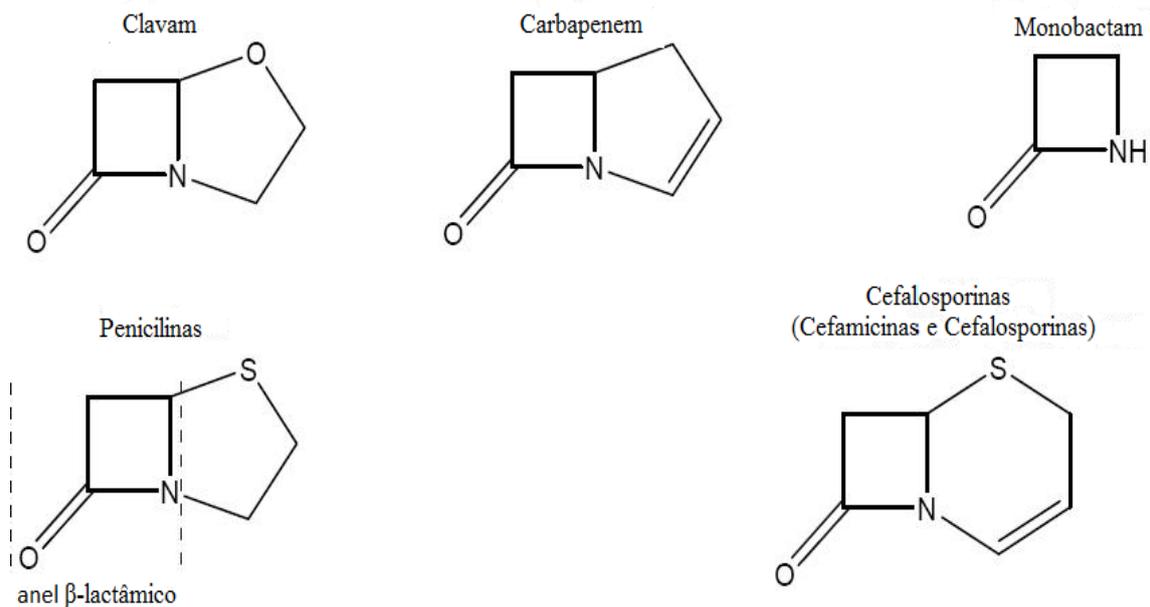
**Revisão Bibliográfica**

## 2.1 ANTIBIÓTICOS B-LACTÂMICOS

Os antibióticos  $\beta$ -lactâmicos são considerados, pela sua grande quantidade e relevância clínica, o mais importante grupo de antibióticos. Fleming descobriu o efeito destrutivo do fungo filamentoso *Penicillium* sobre as bactérias da placa de cultivo em 1928, mas foram os estudos de Florey e Chain, na década de 40 do século XX, que permitiram a produção comercial da penicilina de maneira que pudesse ser útil no tratamento clínico de seres humanos (RAJU, 1999).

A família dos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos apresentam o anel  $\beta$ -lactâmico em sua estrutura, e a classificação dos antibióticos depende do anel ligado ao anel  $\beta$ -lactâmico. Estes antibióticos podem ser divididos em 5 grupos, como mostra a Figura 2.1.

Figura 2.1 - Divisão dos grupos de antibióticos  $\beta$ -lactâmicos.



### 2.1.1 Penicilinas

As penicilinas podem ser divididas em 5 subgrupos, segundo o seu espectro de atividade bacteriana: bencilpenicilinas, isoxazolilpenicilinas, aminopenicilinas, carboxipenicilinas, ureidopenicilinas. As bencilpenicilinas possuem atividade frente a bactérias gram-positivas não produtoras de  $\beta$ -lactamases, bactérias anaeróbias e alguns cocos gram-negativos (principalmente meningococo). As aminopenicilinas apresentam um espectro de ação similar ao das penicilinas de primeira geração e também possuem um maior espectro

de atividade contra outros cocos gram-negativos e outras enterobactérias que não produzem  $\beta$ -lactamases. O quarto grupo denominado carboxipenicilinas e o quinto grupo ureidopenicilinas possuem características de ampliar o espectro de atividade contra bacilos gram-negativos, onde o mais importante a considerar é *Pseudomonas aeruginosa*. A maioria das bactérias anaeróbias gram-positivas são sensíveis às penicilinas, bem como à maioria das bactérias anaeróbias gram-negativas (com algumas poucas exceções, como *Bacteroides fragilis*, que produz  $\beta$ -lactamase) (WRIGHT, 1999).

### 2.1.2 Cefalosporinas

A atividade antibacteriana das cefalosporinas foi descrita pela primeira vez pelo professor Brotzu, da Universidade da Sardenha em 1945, a partir de fungos isolados nos esgotos do porto de Cagliari. Atributos favoráveis das cefalosporinas incluem baixa toxicidade, espectro relativamente amplo de atividade biológica e facilidade de administração. Como resultado do uso generalizado de cefalosporinas, a resistência bacteriana a estes fármacos é cada vez mais comum. As cefalosporinas são classificadas de acordo com sua ordem cronológica de comercialização, ou seja, em primeira, segunda, terceira e quarta gerações e também com base no espectro de atividade contra bacilos gram-negativos, que vai aumentando da primeira para a quarta geração. Com isso, a cefalosporina de última geração (cefepime) apresenta um maior espectro de atividade que combina as vantagens das diferentes cefalosporinas de terceira geração, dentre elas, boa atividade contra bactérias gram-positivas e gram-negativas, como a cefotaxima e ceftriaxona, e atividade comparável à ceftazidima contra *Pseudomonas aeruginosa*. A cefalosporina de última geração também apresenta atividade contra *Staphylococcus aureus* muito maior que as de segunda e terceira geração (MARSHALL, 1999). Na Tabela 2.1 são apresentadas as subclasses das cefalosporinas e seus antibióticos comercializados.

**Tabela 2.1 - Antibióticos  $\beta$ -lactâmicos comercializados.**

Subclasses	Antibióticos
1º Geração	Cefalotin, cefadroxil, cefazolin, cefalexina
2º Geração	Cefaclor, cefotetan, Cefuroxina
3º Geração	Cefotaxime, ceftriaxone, ceftazidime, cefixima
4º Geração	Cefepime

Fonte: Elander, (2003).

Quanto às bactérias anaeróbias, as cefalosporinas possuem uma atividade aceitável contra anaeróbios gram-positivos, mas muito pouco contra *Bacteroides fragilis*, exceto um subgrupo de cefalosporinas de segunda geração, denominadas cefamicinas, que incluem a cefoxitina e cefminox (MARSHALL, 1999).

### 2.1.3 Carbapenem

Estes antibióticos derivam de um composto denominado tienamicina, produzido por uma bactéria denominada *Streptomyces cattleya*. São o grupo de antibióticos  $\beta$ -lactâmicos que possuem o maior espectro de atividade, uma vez que são muito estáveis às  $\beta$ -lactamases. Alguns antibióticos deste grupo são: imipenem, meropenem e ertapenem (CURRAM, SIMPSON e PERRY, 2003).

Estes antibióticos são ativos contra bactérias gram-positivas e gram-negativas. O espectro de atividade dos compostos é muito parecido, embora com algumas pequenas diferenças: imipenem é ligeiramente mais ativo contra bactérias gram-positivas (incluindo *Staphylococcus aureus* sensível à penicilina). Ertapenem possui uma diferença importante em relação ao imipenem e meropenem, não possuem atividade contra *Pseudomonas aeruginosa* (HELLINGER e BREWER, 1999).

### 2.1.4 Monobactam

Dentro deste grupo de antibióticos  $\beta$ -lactâmicos são comercializados dois antibióticos: aztreonam e carumonam (ELANDER, 2003). Segundo Hellinger e Brewer (1999), o aztreonam apresenta a peculiaridade de ser ativo exclusivamente às bactérias gram-negativas aeróbias. Este antibiótico não apresenta atividade às bactérias gram-positivas e anaeróbias, pois possui um espectro de atividade estreito comparado aos outros antibióticos  $\beta$ -lactâmicos.

### 2.1.5 Clavam (Inibidores de $\beta$ -lactamases)

Algumas bactérias são produtoras de uma enzima, denominada  $\beta$ -lactamase, que é capaz de romper o anel  $\beta$ -lactâmico das penicilinas e, portanto, tornam-se resistente a sua ação. Em 1976, no *Beecham Research Laboratories* iniciou-se um programa de triagem de micro-organismos, com a finalidade de isolar inibidores de  $\beta$ -lactamases de ocorrência

natural, que permitiu o isolamento do ácido clavulânico a partir de *Streptomyces clavuligerus*, o qual foi descrito pela primeira vez em 1976 por Brown e seu grupo de pesquisa (BROWN et al., 1976).

Atualmente, é possível combinar uma penicilina com um inibidor de  $\beta$ -lactamase, de modo que o antibiótico fique ativo frente às bactérias produtoras desta enzima. A estrutura dos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos inibidores de  $\beta$ -lactamase está demonstrada na Figura 2.2. As combinações mais importantes do ponto de vista clínico são: amoxicilina com ácido clavulânico, ampicilina com sulbactam e piperacilina com tazobactam (WRIGHT, 1999).

**Figura 2.2 - Estrutura dos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos inibidores de  $\beta$ -lactamase.**

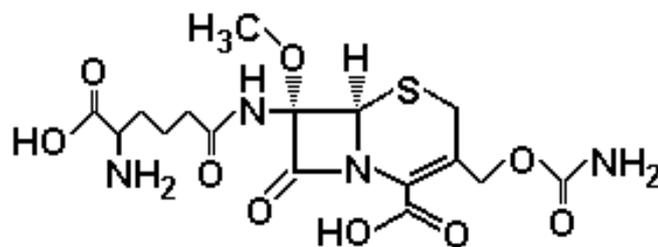


Fonte: Williams, (1999).

### 2.1.6 Cefamicina C

As cefamicinas são antibióticos que pertencem ao subgrupo das cefalosporinas e são utilizadas como matéria-prima para a produção de vários antibióticos. A cefamicina C apresenta a estrutura molecular ilustrada na Figura 2.3.

**Figura 2.3 - Estrutura molecular da cefamicina C.**



O grupo metoxila ligado ao carbono C7 estabiliza a estrutura do anel  $\beta$ -lactâmico, conferindo resistência à degradação pela ação de  $\beta$ -lactamases (DÉVI e SRIDHAR, 2000).

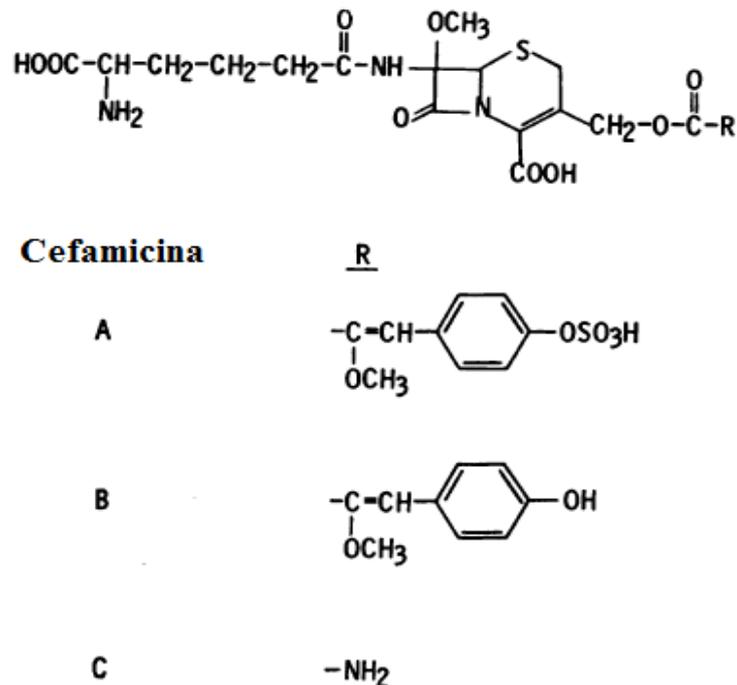
Os componentes da família das cefamicinas são produzidas unicamente por bactérias filamentosas (actinomicetos), sendo a cef C produzida por *Nocardia lactandurans*, *Streptomyces lactanduras* e *Streptomyces clavuligerus* (LIRAS, 1999).

A produção de cef C a partir de *Streptomyces clavuligerus* é descrita na literatura, como sendo em batelada alimentada e em condições de excesso de oxigênio (ROLLINS et al., 1998). Meios contendo amido, água de maceração de milho dentre outros nutrientes são utilizados para a produção de cef C (SARADA e SRIDHAR, 1998).

O *Streptomyces clavuligerus* é capaz de produzir vários metabólitos secundários, dentre eles a cef C e a penicilina N, essa última intermediária das cefalosporinas (PARADKAR, AIDOO e JUNSEN, 1998).

As cefamicinas podem conter diferentes substituintes no carbono C3, que possibilitam sua classificação em A, B ou C, como mostrado na Figura 2.4 (STAPLEY et al., 1972).

Figura 2.4 - Estrutura molecular das cefamicinas A, B e C.

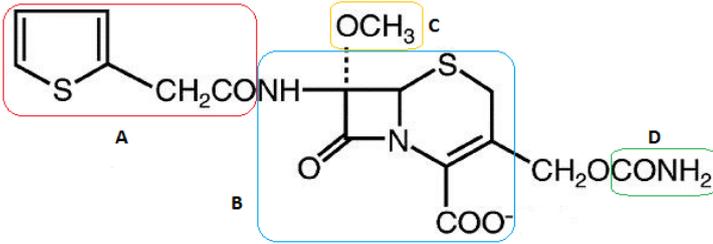


Fonte: Figura adaptada de Stapley et al., (1972).

A cefamicina C é ativa contra organismos gram-negativos, porém não é ativa contra os gram-positivos. Assim, essa molécula precisou ser modificada quimicamente, para aumentar seu espectro de atividade antibiótica. A troca da cadeia aminoácido, na posição 7β da cef C por um grupo tienilacetil, proporcionou o efeito desejado, o que resultou no composto semi-

sintético  $\beta$ -lactâmico, cefoxitin, conforme apresentado na Figura 2.5. O cefoxitin, produzido pela Merck & Co Inc., é amplamente utilizado no tratamento de infecções e na prevenção de infecções pós-operatórias por bactérias resistentes à penicilina (OMSTEAD, HUNT e BUCKLAND, 1985).

Figura 2.5 - Estrutura molecular do cefoxitin.



Nomenclatura	Estrutura	Contribuição para a Atividade
Tienilacetil	A	Boa atividade Gram-positiva
Núcleo Cephem	B	Atividade global, particularmente Gram-negativa
Metoxi	C	Estabilidade às lactamases
Carbamoil	D	Estabilidade metabólica <i>In vivo</i>

Fonte: Figura adaptada de Omstead et al. (1985)

Nos próximos itens são apresentados alguns dos processos comumente utilizados para promover a separação e purificação de produtos biotecnológicos, bem como trabalhos existentes na literatura acerca do tema, nos quais foram utilizados estas técnicas.

Diante das características dos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos apresentados neste item, especialmente, referente à cefamicina C, pode-se concluir que as maiores vantagens da utilização deste produto referem-se à sua atividade frente às bactérias gram-negativas, além da sua resistência à ação das enzimas  $\beta$ -lactamases, que são capazes de romper o anel  $\beta$ -lactâmico do antibiótico, tornando-o inativo.

## 2.2 EXTRAÇÃO DE PRODUTOS BIOTECNOLÓGICOS POR SISTEMA DE DUAS FASES AQUOSAS (SDFA)

A extração de biomoléculas em sistemas de duas fases líquidas imiscíveis, constituídas de uma fase aquosa e um solvente orgânico, é utilizada há cerca de 60 anos na purificação de antibióticos e ácidos orgânicos. Para proteínas, no entanto, tais sistemas não são adequados devido à sensibilidade dessas moléculas à desnaturação promovida por solventes orgânicos, além destes compostos representarem riscos à saúde humana e ao meio ambiente, de forma geral, devido à sua alta toxicidade. Nos últimos anos, com as novas normas de controle ambiental, mais rígidas, as indústrias estão sendo obrigadas a investir em tecnologias mais limpas (FRANCO et al., 2005)

Uma alternativa à extração por solventes orgânicos, as biomoléculas podem ser purificadas em sistemas de duas fases aquosas imiscíveis. A purificação é resultado de uma partição diferenciada da molécula-alvo e impurezas entre as duas fases líquidas. O elevado teor de água, 75% a 80% em massa, garantem as propriedades biológicas das biomoléculas (ALBERTSSON, 1986).

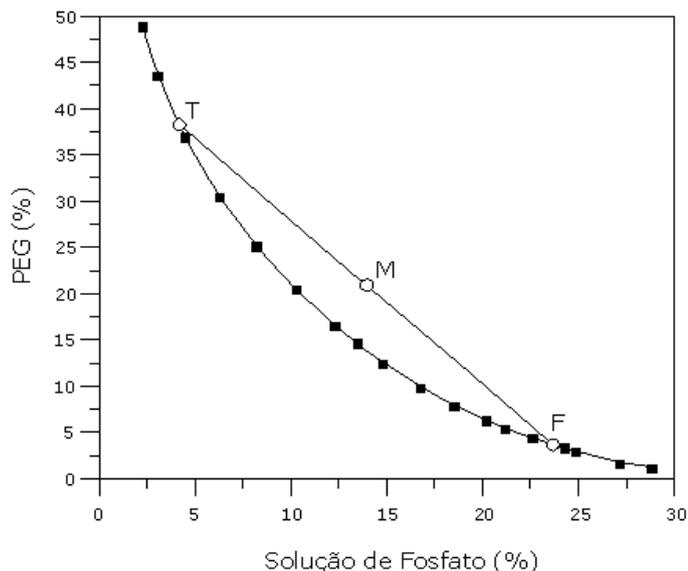
Em biotecnologia, a extração por meio de duas fases aquosas é conhecida como uma ferramenta muito promissora para a captura de proteínas e peptídeos. Como ambas as fases envolvidas são à base de água, não existe qualquer interação indesejável entre as biomoléculas e as duas fases aquosas (RIEDL e RAISER, 2007).

Um sistema de duas fases aquosas ocorre quando se dissolvem, num meio aquoso, dois componentes imiscíveis. Estes podem ser dois polímeros (sistema polímero-polímero) ou um polímero e um sal (sistema polímero-sal). Para concentrações acima das definidas para uma zona de equilíbrio, também denominada curva binodal, leva à formação de duas fases líquidas, predominando cada um dos componentes em uma ou em outra fase. A formação de um sistema de duas fases aquosas depende, portanto, da concentração dos componentes do sistema. A Figura 2.6 representa um exemplo genérico de um diagrama de fases e linha de amarração de polietileno glicol e fosfato). A reta TMF é chamada linha de amarração ou *tie-line*. Sistemas cuja composição inicial encontra-se sobre a linha de amarração possuem a mesma composição final, porém a relação de volumes entre as fases é diferente para cada composição, de acordo com a razão entre os segmentos  $\overline{MF}$  e  $\overline{MT}$ , a qual é igual a razão entre os volumes de fundo e topo (FRANCO et al., 2005).

Na década de 1950, Albertsson descobriu que o polietileno glicol (PEG), fosfato de potássio e água, e assim como o PEG, dextrana e água formavam sistemas de duas fases

aquosas. Os sistemas de PEG/dextrana/água e PEG/sal/água têm sido, desde então, frequentemente investigados e utilizados para purificação de grande número de biomoléculas (ALBERTSSON, 1986).

**Figura 2.6 – Exemplo genérico de um diagrama de fases e linha de amarração (PEG/fosfato).**



As vantagens do SDFA são: a facilidade e confiabilidade no aumento de escala; rápida transferência de massa; equilíbrio alcançado com recursos a baixa energia na forma de mistura mecânica; possibilidade de se desenvolver um processo contínuo de extração; separação rápida e seletiva; possibilidade de conduzir a extração à temperatura ambiente e mais economia do que em outros processos de separação convencionais como cromatografia (ALBERTSSON, 1986). Sarmiento et al. (1994) também relata sobre as vantagens da utilização do SDFA. As extrações líquido-líquido utilizando SDFA em grande escala está limitado aos sistemas de PEG/dextrana e PEG/sal (fosfato, citrato ou sulfato). Devido estes sistemas apresentarem uma série de vantagens como baixo custo de seus componentes, atoxidade, grande faixa de aplicação e menor tempo para separação, quando comparado a outros processos de separação convencional, como cromatografia.

Lee e Sandler (1990) estudaram a separação de vancomicina, um antibiótico glicopeptídeo, e examinaram os efeitos de pH, adição de sais, adição de ligantes afins e suas respectivas concentrações na partição dessa biomolécula em SDFA (PEG/dextrana) e (PEG/fosfato). Os autores concluíram que a partição da vancomicina era influenciada pela presença de diferentes sais no sistema e, verificou ainda que houve um aumento do coeficiente de partição com a utilização de sulfato de sódio e cloreto de sódio. Os valores de

coeficiente partição encontrados para o sistema PEG/fosfato, em função das concentrações dos sais, foram superiores a 100.

Yang e Chu (1990) estudaram a extração da penicilina G do caldo fermentado e de uma solução pura, e obtiveram valores de coeficiente de partição entre 10,4 e 15,2.

Yang et al., (1994) realizaram a extração da cefalosporina C do caldo fermentado e do caldo diluído por um S DFA PEG/sal. Foram investigados os efeitos do pH, peso molecular do PEG e adição de sais e suas concentrações, para a determinação de um sistema de extração adequado. Os resultados obtidos demonstraram que, embora a recuperação de cefalosporina C não tenha alcançado bons resultados para extração em uma única etapa, houve vantagens como a separação da cefalosporina C, da deacetilcefalosporina C e, facilidade de isolamento do produto de uma grande quantidade de massa celular e do caldo viscoso sem uma diluição significativa.

Videiras e Aires Barros (1994) realizaram a extração do clavulanato de potássio de uma solução pura, em um sistema de duas fases aquosas (S DFA), composto por polietileno glicol e fosfato (PEG/fosfato), variando o pH, peso molecular do PEG e a relação PEG/fosfato. Para as condições estudadas, os autores concluíram que o ácido clavulânico (AC) possui uma alta afinidade pela fase rica em PEG, apresentando altos valores de recuperação (90-99%). Os valores obtidos para o coeficiente de partição foram de 1,5 a 114.

Hirata (2003) estudou o processo de extração de AC por S DFA (PEG/fosfato de potássio). Foi observado que com este sistema foi possível obter coeficiente de partição muito superior à unidade e altos valores de recuperação de AC em alguns sistemas, até 94%.

Esmanhoto e Kilikian (2004) realizaram a extração do antibiótico retamicina em S DFA com PEG/citrato de sódio e verificaram a influência de quatro fatores: massa molecular do PEG, pH, tempo de contato entre as fases e força de centrifugação. Os valores obtidos do coeficiente de partição para retamicina foram entre 0,63 e 4,71.

Estudos realizados por Shang et al. (2004), utilizando o S DFA composto por PEG/fosfato, para separação de quatro aminoácidos: cisteína, fenilalanina, metionina e lisina, demonstraram que o aumento do pH (6,4-8) e da massa molecular do PEG (5000-10000) favorece o aumento do coeficiente de partição destes aminoácidos. Porém, somente na extração com PEG 10000, os coeficientes de partição para os aminoácidos cisteína e fenilalanina foram superiores a 2,5.

Brites (2005) compararam dois diferentes métodos de extração do ácido clavulânico do caldo de fermentação: extração por solvente orgânico e extração por S DFA. Na extração por solvente orgânico, foram testados os seguintes solventes: etil acetato, butil acetato, metil isobutil cetona, n-butanol e 2-butanol, sob diferentes valores de pH (entre 2 e 5). Para o S DFA foi utilizado o sistema PEG/fosfato. Os pesos moleculares de PEG testados foram: 6000, 4000, 1000, 600 e 400, e a solução de fosfato com pHs 6,0 e 7,0. O melhor solvente orgânico, em termos de coeficiente de partição, foi o n-butanol ( $k_p = 1,37$ ). Para o S DFA foram obtidos coeficientes de partição muito altos para o PEG 600 e, 15,5 para o PEG 6000.

A extração da protease fibrinolítica produzida por *Streptomyces Sp.* DPUA1576 do caldo de fermentação foi realizada pelo S DFA, utilizando o PEG e fosfato de potássio. Foi investigado neste trabalho a influência do pH, peso molecular de PEG e a concentração da solução de fosfato no coeficiente de partição da protease fibrinolítica. O maior coeficiente de partição obtido para a enzima foi de 37,0 na fase rica em PEG, obtido no sistema de 20% (p/p) de PEG 1500 (g/mol) e 14% (p/p) de fosfato a pH 8,0. O sistema que permitiu a maior extração foi de 15% (p/p) de PEG 3350 (g/mol) e 12% (p/p) de fosfato, a pH 7,0. Nestas condições o fator de purificação (FP) foi de 1,51 e coeficiente de partição de 6,41 (SILVA et al., 2013).

O trabalho de Porto et al., (2008) trata da utilização de sistemas de duas fases aquosas (PEG/citrato) para remover proteases de um caldo de fermentação produzido pelo micro-organismo *Clostridium perfringens*. O estudo demonstrou que o FP das proteases na fase de topo aumenta com o aumento do peso molecular de PEG, e com a redução da concentração do citrato. O oposto foi verificado para o coeficiente de partição. Por outro lado, o rendimento (Y) foi favorecido pela redução simultânea em ambas as variáveis, enquanto que a seletividade (S) diminui com o aumento da concentração de citrato. O melhor sistema obtido para um aumento simultâneo do FP e rendimento foi: 22% (p/p) de PEG 10.000 (g/mol), 8% (p/p) de citrato a pH 8,5 (rendimento de 131%) e o fator de purificação de 4,2. De acordo com os resultados, o S DFA não é suficientemente seletivo para proporcionar a purificação total da enzima, mas deve ser considerado como uma etapa primária importante de concentração e descontaminação no processo de purificação global da enzima.

Pereira et al. (2012) realizaram um estudo da extração líquido-líquido do ácido clavulânico (AC) por meio do S DFA, formadas pela mistura de dois polímeros (PEG e poliácrlato de sódio - NaPA) com um sal (NaCl ou Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) e solução aquosa de ácido clavulânico. A estabilidade do AC na presença de ambos os polímeros foi investigada e

observou-se que estes polímeros não promovem a degradação da biomolécula. O sistema com a composição de 10% (p/p) de PEG 4000, 20% (p/p) de NaPA 8000 e 6% (p/p) de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> foi selecionado como o ideal em termos de recuperação do AC do caldo fermentado de *Streptomyces clavuligerus*. O coeficiente de partição para o AC a partir do caldo fermentado foi de 9,15 e para o AC comercial foi de 11,9, mostrando que o sistema de duas fase aquosas de PEG/NaPA/Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pode ser utilizado como um novo processo de purificação e concentração do AC.

A partir da análise dos resultados obtidos nos trabalhos citados, dentre outros, verificou-se que são diversos os fatores que influenciam a formação e a separação de biomoléculas, entre duas fases aquosas. Dentre eles, destacam-se os fatores inerentes ao próprio sistema, como por exemplo, os componentes do sistema, a massa molecular do polímero ou do sal, bem como suas respectivas concentrações, além do pH e da temperatura do sistema. Ou ainda, devido às características físico-químicas das biomoléculas, como: hidrofobicidade, distribuição de cargas, pontos isoelétricos e massa molecular.

## 2.3 CROMATOGRAFIA

O processo de cromatografia tem por objetivo isolar e purificar o metabólito de interesse em relação aos demais, obtendo a pureza adequada ao seu uso. A redução do volume do meio original é de fundamental relevância para a economia do processo, pois os métodos cromatográficos são, na maioria, baseados em fenômenos de adsorção, além de lentos e dependentes de investimentos em materiais adsorventes. Na cromatografia líquida, os solutos (metabólitos celulares) presentes em um meio líquido são retidos em leito de material poroso, por meio de fenômenos de adsorção (química ou física) e partição (exclusão molecular). (KILIKIAN, 2005).

A seguir são apresentados os métodos de cromatografia utilizados para fins industriais, quais sejam: (a) exclusão molecular; (b) afinidade; (c) hidrofóbica e (d) troca iônica.

### a) Cromatografia de exclusão molecular

O princípio básico da cromatografia por exclusão molecular, também conhecida como filtração em gel ou cromatografia de peneira molecular, é a separação em relação ao tamanho da molécula, que são geralmente proporcionais ao peso molecular. Este processo consiste na

partição das moléculas, de acordo com as suas dimensões, entre um solvente (fase móvel) e uma fase estacionária de porosidade definida.

A separação de uma mistura de moléculas com diferentes tamanhos, as moléculas menores penetram nos poros da matriz e, então se movem lentamente na coluna. Dessa forma, as moléculas são eluídas de acordo com o decréscimo de tamanho. Assim, em um cromatograma as moléculas menores são as últimas a deixar a coluna (MORAES E ROSA, 2005).

### **b) Cromatografia de afinidade**

A cromatografia por afinidade é uma técnica de separação que depende das interações altamente específicas entre os pares de materiais biológicos: enzima-substrato, enzima-inibidor, antígeno-anticorpo. Um dos componentes dessa interação, denominado ligante, é imobilizado em um suporte insolúvel (matriz porosa), e o outro componente é seletivamente adsorvido neste ligante, previamente imobilizado. O componente adsorvido pode ser eluído com uma solução que enfraqueça as interações entre os dois componentes. A cromatografia de afinidade pode ser descrita desta maneira: o mecanismo de separação envolvido é a afinidade biológica, e as características dessa técnica são: alta seletividade, alta capacidade dependente do ligante e alta velocidade. O uso dessa técnica é recomendado após a remoção ou redução dos contaminantes por métodos mais econômicos (KAMIMURA e MAUGERI FILHO, 2005).

### **c) Cromatografia de interação hidrofóbica**

A cromatografia de interação hidrofóbica é uma técnica de separação, que baseia-se na associação entre proteínas e ligantes hidrofóbicos, imobilizados em suporte sólido. Esses ligantes são obtidos pela fixação de grupos de cadeia curta (butil, octil, fenil) na superfície de um suporte sólido, mediante braços ou espaçadores. Nesta cromatografia as moléculas protéicas em solução salina são adsorvidas em um suporte hidrofóbico e depois eluídas por um agente tensoativo. A cromatografia de interação hidrofóbica é uma técnica simples com ampla aplicação, não sendo limitada apenas à separação de biomoléculas (MAUGERI FILHO e TABOADA, 2005).

#### **d) Cromatografia de troca iônica**

O princípio básico da cromatografia de troca iônica é a competição entre íons de interesse e contaminantes pelos grupos carregados da matriz ou fase estacionária. Na troca iônica ocorre uma etapa de adsorção reversível de moléculas do soluto, eletricamente carregados, a grupos com cargas opostas, imobilizadas em uma matriz sólida. Esta técnica possui diversas aplicações analíticas e preparativas, tanto em pesquisa quanto em indústrias.

No mecanismo da troca iônica os solutos com cargas de sinais contrários aos da fase estacionária (resina) são seletivamente adsorvidos da fase móvel. Enquanto que os solutos com a mesma carga da resina, não são adsorvidos. Na etapa de eluição, os solutos são desorvidos da resina, em função da mudança da composição do eluente, com maior afinidade pela fase estacionária. Dessa forma, os componentes de interesse são removidos da coluna, de acordo com a força de ligação, sendo que aqueles que possuem ligação mais fraca são desorvidos primeiro (PESSOA Jr., 2005).

### **2.4 PURIFICAÇÃO DE PRODUTOS BIOTECNOLÓGICOS POR CROMATOGRAFIA**

Na literatura é encontrada uma grande variedade de trabalhos envolvendo estudos do processo de adsorção, para a recuperação de produtos biotecnológicos. Neste tópico serão apresentados alguns destes trabalhos.

Processos de purificação da cefalosporina C foram descritos por Ghosh, Bora e Dutta, (1996). No primeiro processo as células foram removidas por microfiltração, e as proteínas e os polissacarídeos, por ultrafiltração. O caldo ultrafiltrado foi concentrado por osmose reversa, e o antibiótico purificado por cromatografia líquida de alto desempenho, obtendo-se uma recuperação de, aproximadamente, 95%. No segundo processo foi utilizada uma combinação de ultrafiltração, coluna cromatográfica e osmose reversa. Segundo o autor, a utilização da sequência de colunas cromatográficas, resina trocadora de base fraca (Diaion WA-30), adsorvente poliaromático neutro (Diaion HP-20), e trocadora de cátions de ácido forte (Diaion SK-1B), podem levar à recuperação superior a 90%. O método de purificação foi concluído com a secagem do produto, obtendo-se a cefalosporina na forma de sal de sódio ou potássio.

O estudo da adsorção de alguns antibióticos  $\beta$ -lactâmicos em resinas poliméricas e carvão ativado foram realizados por Dutta, Dutta e Bhattacharya, (1999). Os antibióticos

testados foram o ácido 7-aminocetilsalicílico (7-ACA), cefalexina, cefadroxil e ácido 6-aminopenicilânico (6-APA). Os experimentos foram realizados com as resinas poliméricas não-iônicas Amberlite XAD-2, XAD-4, XAD-7 e XAD-16. Os resultados mostraram que a afinidade de adsorção ( $q/c_e-1/g$ ) está diretamente relacionada com a entalpia de adsorção ( $\Delta H$ ). Para a resina XAD-7 foram obtidos os menores valores de afinidade de adsorção entre (0,003-0,005) e para o carvão ativado os maiores valores entre (0,179-0,470).

Barboza et al., (2002) realizaram a recuperação do ácido clavulânico por cromatografia de troca iônica, com a resina Amberlite IRA-400. Os experimentos foram realizado sem reatores encamisados de 200 mL, em dois diferentes pHs (6,2 e 4,0) e com temperaturas de 10 e 20 °C durante a adsorção, e 30 °C durante a dessorção. As melhores condições observadas durante o processo de adsorção foram sob pH 6,2 e temperatura de 10 °C, haja visto que o ácido clavulânico é mais estável nesse pH, e sua adsorção é favorecida nessa temperatura.

Em outro trabalho de Barboza et al., (2003), foi avaliada a influência da temperatura sobre a cinética de adsorção e dessorção do AC em resina de troca iônica. Neste trabalho foram realizados experimentos nas temperaturas de 5, 10, 23 e 30 °C. A resina de troca iônica utilizada foi Amberlite IRA-400 e o modelo proposto para descrever o comportamento de equilíbrio em todos os experimentos foi o de Langmuir. Os resultados obtidos para as constantes de afinidade ( $K_L$ ) e máxima capacidade de adsorção ( $q_m$ ) são apresentados na Tabela 2.2.

**Tabela 2.2 - Valores de constante de afinidade e máxima capacidade de adsorção para a cefalosporina C.**

Temperatura (°C)	Constante de afinidade – $K_L$ (g/L)	Máxima capacidade de adsorção - $q_m$ (g <sub>CA</sub> /g <sub>res</sub> )
5	0,0314	0,0151
10	0,0394	0,0228
23	0,0722	0,0246
30	0,0863	0,0267

Fonte: Barboza et al. (2003)

Os valores de  $K_L$  obtidos mostraram que o processo tornou-se desfavorável com o aumento da temperatura. Este comportamento pode ser analisado a partir do estado de agitação das moléculas iônicas ( $AC^-$  e  $Cl^-$ ) que se ligam aos sítios ativos carregados da resina. Em temperaturas altas, a frequência de choques é maior e favorece a dessorção.

Pinotti et al. (2009) realizaram experimentos para avaliar a recuperação e purificação parcial de penicilina G acilase, produzida a partir de dois micro-organismos, *E. coli* e *B. megaterium*, utilizando uma coluna de adsorção em leito expandido. A adsorção de penicilina G acilase (PGA) foi realizada com utilização de uma resina catiônica Streamline SP XL. Os ensaios de estabilidade mostraram que as acilases a partir das duas fontes estudadas apresentaram desativação irreversível com pH 4,0 e 4,5, mas manteve-se no pH 4,8. Ensaios de adsorção realizados em leito fixo, no intervalo de pH de 4,8 – 5,8, mostraram maiores rendimentos de adsorção, para as duas enzimas, quando no seu limite inferior. Utilizando uma coluna pequena de leito expandido, a PGA foi diretamente recuperada e parcialmente purificada a partir de caldo bruto, ou homogeneizada de *E. coli*, ou de caldo centrifugado de *B. megaterium*. Os rendimentos de recuperação global obtidos foram de 91, 55 e 7,4 e os fatores de recuperação de 4,5, 7,5 e 12,7, respectivamente. Os fragmentos celulares interferem drasticamente na adsorção da PGA na resina Streamline SP XL.

Estudos cinéticos e termodinâmicos de equilíbrio da cefotaxima em resina de troca iônica foram realizados em shakers, a 180 rpm. As temperaturas testadas foram 25, 35 e 40 °C. Os resultados relativamente baixos de entalpia de adsorção ( $\Delta H < 40$  kJ/mol) indicam que as interações entre as partículas e as moléculas da droga são físicas. Por outro lado, o valor positivo mostra que o processo de adsorção é endotérmico, este comportamento de  $\Delta H$  indica que o aumento da temperatura conduziu ao aumento da quantidade adsorvida de cefotaxima. A energia livre de Gibbs ( $\Delta G$ ) é um critério fundamental para determinar se um processo ocorre espontaneamente. Os valores negativos obtidos para  $\Delta G$  indicam a viabilidade e a natureza espontânea do processo de adsorção da cefotaxima (VASILIU et al., 2011).

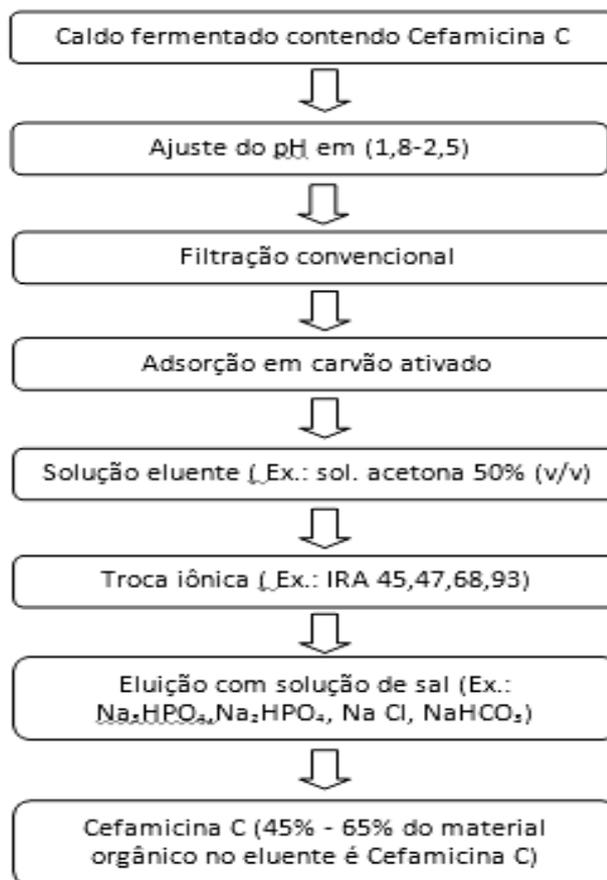
Silva et al. (2012) estudaram a separação do ácido clavulânico (AC) a partir de caldo fermentado de aminoácidos por um sistema de duas fases aquosas e adsorção por troca iônica. Após a fermentação, subprodutos de baixo peso molecular, como lisina, histidina, prolina e tirosina estavam presentes no caldo fermentado. Para remover as impurezas foram utilizadas técnicas de extração por sistema de duas fases aquosas, composta por 17% (p/p) de PEG com peso molecular de 600 e 15% (p/p) de fosfato de potássio para uma purificação parcial. Em seguida, foi realizada a adsorção por troca iônica para a recuperação do AC da fase de topo e sua purificação, obtendo como resultados o fator de concentração de 2 e purificação de 100%, em relação aos aminoácidos lisina, histidina, prolina e tirosina.

## 2.5 PROCESSOS DE SEPARAÇÃO E PURIFICAÇÃO DA CEFAMICINA C

Em relação ao isolamento e purificação da cef C são encontrados poucos trabalhos na literatura e a maioria está disponível somente na forma de patentes, onde os procedimentos são descritos a seguir.

Pines (1976), descreve em sua patente a filtração do caldo em pH ácido, adsorção em carvão ativado e eluição do antibiótico retido com mistura de água e solvente polar. O antibiótico é separado por meio de cromatografia utilizando resina de troca aniônica. O fluxograma do processo de purificação e concentração da cef C realizado por Pines é descrito por Omstead et al. (1985), e demonstrado na Figura 2.7.

**Figura 2.7 - Purificação da cefamicina C: processo com carvão ativado e troca iônica.**



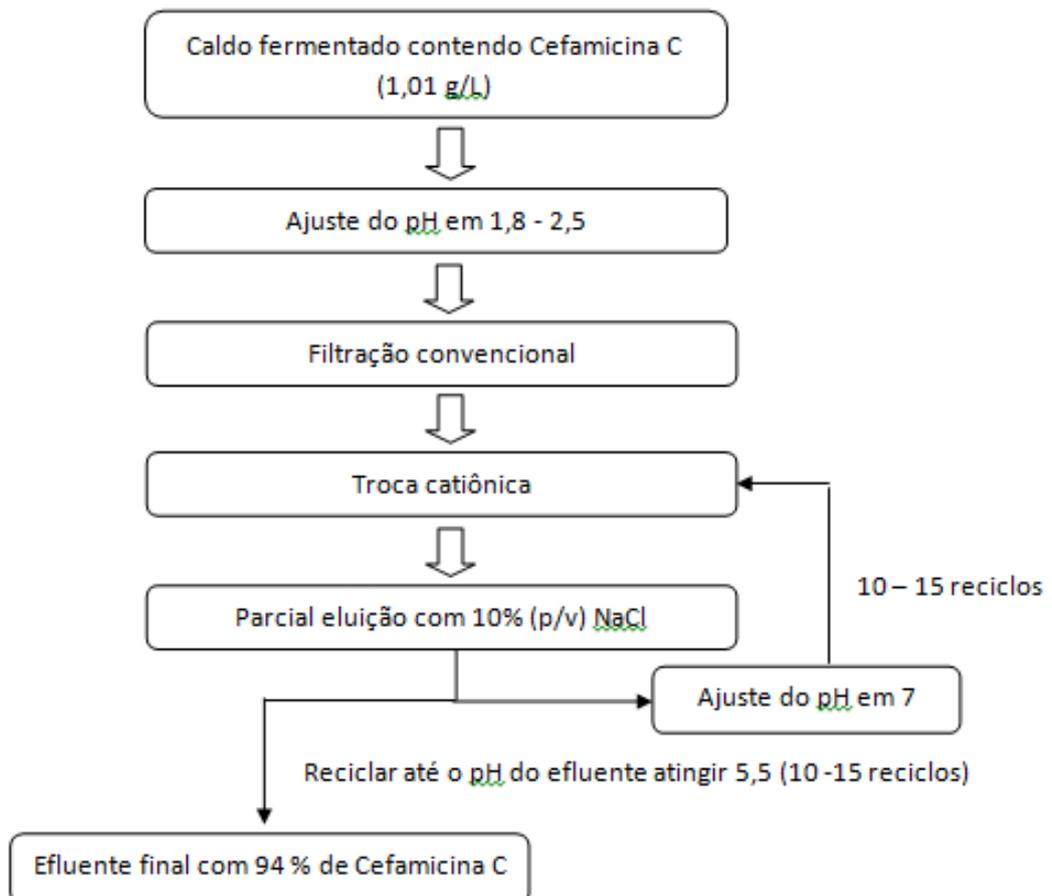
Fonte: Figura adaptada de Omstead et al. (1985)

Nesta patente, Pines (1976) relata que resinas fracamente aniônica são preferíveis para o processo, tal como as resinas IRA45, IRA47, IRA68 e IRA93. Com a utilização destes

materiais foram obtidas purezas de 45 a 65% de cef C, em relação aos compostos orgânicos, e 65% da quantidade original do antibiótico.

Em outra patente descrita por Schubert (1980), a purificação e concentração da cef C é feita por meio da sequência ilustrada na Figura 2.8. Neste processo, o caldo fermentado tem seu pH ajustado na faixa de 1,8 - 2,5, e em seguida é submetido a uma filtração convencional. O filtrado obtido é adsorvido em uma coluna com resina de troca catiônica, a qual é lavada com água. A fase estacionária é então eluída com solução de NaCl 10% (m/v). O material coletado tem seu pH ajustado para 7, o qual é então repassado pela coluna até atingir o pH entre 5,5 e 6,5. Este procedimento deve ser repetido de 10 a 15 vezes. A eficiência deste processo é maior em relação ao processo de adsorção em carvão ativado do processo de Pines (1976). O autor relata a obtenção de 94% da quantidade original de cef C.

**Figura 2.8 - Purificação da cefamicina C: processo com reciclo e resina catiônica.**



Fonte: Figura adaptada de Omstead et al., 1985.

Kawamura, Shoji e Matsumoto (1981), descrevem a utilização do processo de separação semelhante ao descrito por Pines (1976), porém relatam a utilização da resina BioRex-5 (troca de íon cloreto).

Na patente de Kamogashira et al. (1982), o processo de purificação da cef C, consiste na adsorção do caldo filtrado em resina Diaion PA 406, produzida por Mitsubishi Chemical Co., Ltda., em coluna de leito fixo. Após a lavagem da coluna com água deionizada, a cef C foi então eluída com NaCl 1M pa. O pH da fração coletada foi ajustado para 1 e em seguida foi adsorvida em coluna com a resina Diaion HP20, produzida por Mitsubishi Chemical Co, Ltda., e eluída com água.

Brown et al. (1983) descrevem como alternativa ao uso do carvão ativado, a utilização de resina não-iônica, como as resinas Amberlite XAD-2 ou XAD-4. Também ressaltam a necessidade de utilização de resina aniônica para a purificação da cef C, citando a resina QAE-Sephadex, comercializada pela Pharmacia UK Ltda., GE, ou Dowex-1, comercializada pela Bio-Rad Laboratories Limited, que contém amônio quaternário nas ligações para a formação do trocador aniônico.

No trabalho de Rodriguez (2011), foram propostos modelos matemáticos que representam a cinética e equilíbrio da adsorção da cef C, em resina de troca iônica StreamLine QX-L. Por meio dos ensaios experimentais em batelada foi avaliada a influência de pH (2,8, 4,7 e 6,8) e da temperatura (13, 20 e 30 °C) sobre o sistema, analisando os parâmetros intrínsecos que representam o modelo, foram calculados por regressão não-linear. Os resultados mostraram que a resina StreamLine QX-L adsorve a cef C em torno de 0,25 mg/g, sendo que maiores valores podem ser alcançados com maiores concentrações iniciais de cef C e em pH 4,7. A melhor condição encontrada foi em pH 6,8 à temperatura de 30 °C, pois forneceu a capacidade máxima de adsorção sem perda substancial de afinidade adsorvente-adsorbato. Dessa maneira, todas as simulações do processo contínuo foram conduzidas nesses valores de pH e temperatura. Os valores de referência utilizados para a cef C foram: concentração inicial ( $C_0$ ) de 70 mg/L, capacidade máxima de adsorção ( $q_m$ ) de 0,22 mg/g, constante cinética de adsorção ( $k_{ads}$ ) de 12,08 L/g.min e constante cinética de dessorção ( $k_{des}$ ) de 0,054 min<sup>-1</sup>.

Diante dos trabalhos citados de purificação de antibióticos e outros produtos biotecnológicos, a técnica de cromatografia é amplamente utilizada para esta finalidade, devido aos bons resultados obtidos. O processo de cromatografia de troca iônica foi utilizado por Silva et al. (2012), para a separação do ácido clavulânico da fase de topo, utilizando as

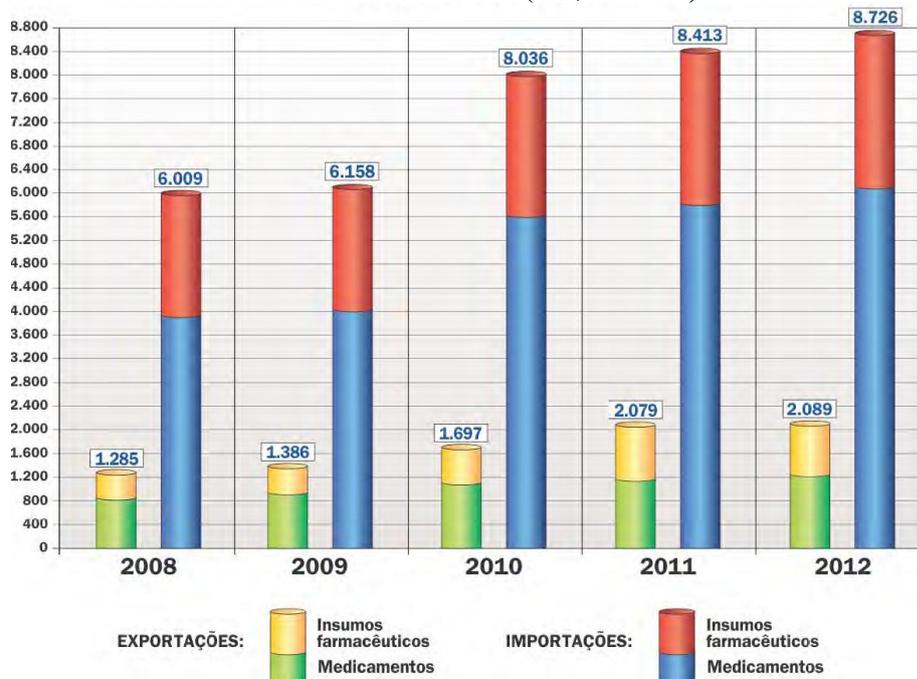
resinas aniônicas Amberlite IRA 400 e Streamline Q XL. Os resultados obtidos ao final do processo mostraram-se satisfatórios, de modo a influenciar a escolha de tais resinas para a realização do presente trabalho.

## 2.6 SITUAÇÃO ATUAL DO MERCADO BRASILEIRO DE MEDICAMENTOS

Dada a importância do assunto e a crescente demanda do mercado nacional de farmoquímicos, neste tópico serão apresentados alguns dados estatísticos, divulgados pela Associação Brasileira da Indústria Farmoquímica e de Insumos Farmacêuticos (Abiquifi), acerca de relações comerciais internacionais de insumos farmacêuticos e medicamentos.

A atual situação do mercado brasileiro em relação à importação e exportação destes produtos mostra como o Brasil ainda é carente na produção de farmoquímicos. Apesar das exportações terem aumentado significativamente na última década (entre 2002 e 2012), ainda é muito inferior ao volume de medicamentos importados, como pode ser observado na Figura 2.9. O déficit da cadeia produtiva farmacêutica brasileira registrou crescimento de 4,8%, saltando de US\$ 6,334 bilhões em 2011, para US\$ 6,637 bilhões em 2012.

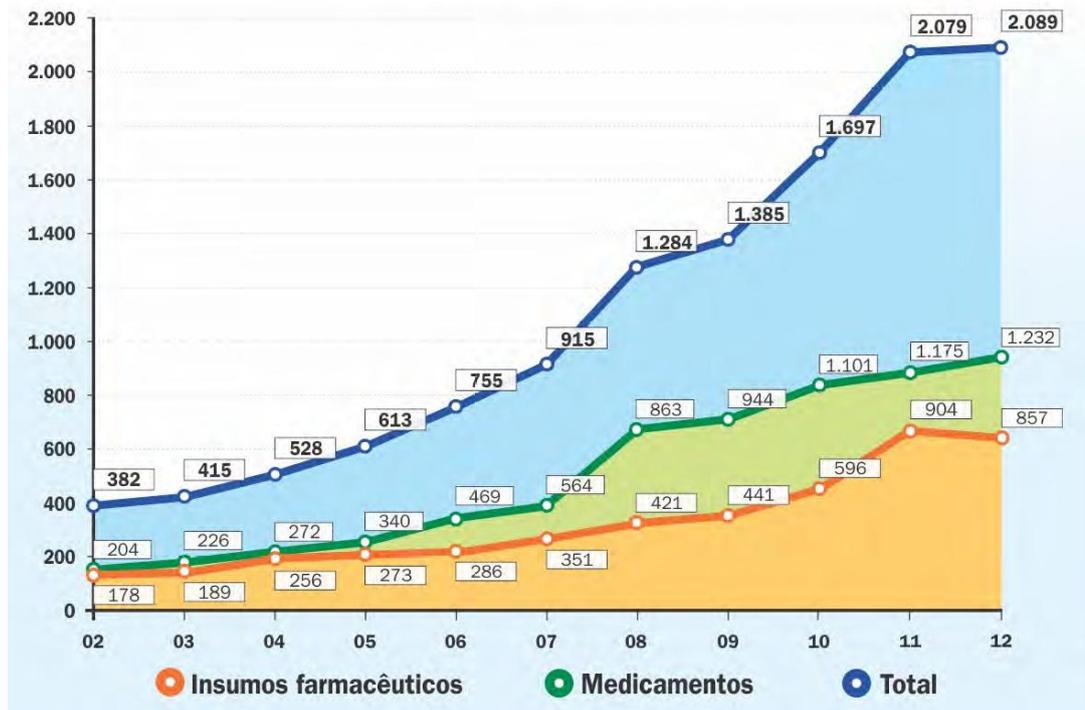
**Figura 2.9 - Cadeia produtiva farmacêutica: Comparação entre importações e exportações de medicamentos e de insumos farmacêuticos em (US\$ milhões) entre 2008 e 2012.**



Fonte: Abiquifi - [www.abiquifi.org.br](http://www.abiquifi.org.br).

Com relação à exportação de insumos farmacêuticos e de medicamentos pode-se observar na Figura 2.10, que a exportação de insumos farmacêuticos em 10 anos recuou de US\$ 904,6 milhões em 2011 para US\$ 857,6 milhões em 2012, que equivale a um recuo de 5,2%. Enquanto que a exportação de medicamentos obteve um crescimento de 4,8%.

**Figura 2.10 - Exportações brasileiras de medicamentos e de insumos farmacêuticos (US\$ milhões) entre 2002 e 2012.**



Fonte: Abiquifi - [www.abiquifi.org.br](http://www.abiquifi.org.br).

As cefalosporinas são antibióticos que representam uma classe de antibacterianos muito importantes no arsenal terapêutico brasileiro. Em 2012, até novembro, foram exportados US\$ 9,4 milhões destes antibióticos, enquanto que no ano de 2010 foram US\$ 3,3 milhões, como pode ser visto na Tabela 2.3.

Dentro dos 10 principais produtos importados pelo Brasil entre os anos de 2010 e 2012, demonstrados na Tabela 2.4. Estão relacionados os antibióticos da classe das penicilinas, mostrando que houve um decréscimo da importação desses medicamentos, de 18,5% em 2 anos.

**Tabela 2.3 - Os 10 principais produtos exportados pelo Brasil entre os anos de 2010 e 2012 em US\$ (milhões).**

2010		2011		2012	
ésteres e sais de lisina	45,6	virginiamicina	54,2	virginiamicina	41,3
heparina	41,5	heparina	46,2	sais biliares	41,2
virginiamicina	41,3	lisina	22,1	heparina	29,6
sulfato de condroitina	15,6	sulfato de condroitina	15,6	sulfato de condroitina	19,5
HGC	10,7	rutina	13,7	lisina	17,3
quercetina	8,3	HGC	12,1	rutina	16,0
nitrato e cloridrato de pilocarpina	6,4	nitrato e cloridrato de pilocarpina	6,7	outras cefalosporinas	9,9
outras cefalosporinas	3,3	outras cefalosporinas	6,5	HGC	9,7
cefaclor / cefalexina	3,3	quercetina	5,5	nitrato e cloridrato de pilocarpina	6,0
monensina sódica	2,9	monensina sódica	4,8	quercetina	3,9

Fonte: Abiquifi - [www.abiquifi.org.br](http://www.abiquifi.org.br).

**Tabela 2.4 - Os 10 principais produtos importados pelo Brasil entre os anos de 2010 e 2012 em US\$ (milhões).**

2010		2011		2012	
acetato de alfa-tocoferol	65,9	acetato de alfa-tocoferol	65,1	insulina	97,1
acetato de vitamina A	65,9	dipirona	52,0	acetato de alfa-tocoferol	58,2
insulina	62,0	insulina	51,6	dipirona	40,9
dipirona	46,2	amoxicilina e seus sais	34,8	heparina	36,4
vitamina C	36,4	acetato de ciproterona	33,9	acetato de ciproterona	34,7
acetato de ciproterona	35,9	vitamina C	22,8	amoxicilina e seus sais	28,7
amoxicilina e seus sais	35,2	ivermectina	26,7	cetoprofeno	27,5
ivermectina	23,9	cetoprofeno	19,5	brometo de butil escopolamina	18,1
cetoprofeno	19,4	brometo de butilescopolamina	18,8	vitamina C	17,2
levonorgestrel	17,8	levonorgestrel	18,6	levonorgestrel	13,3

Fonte: Abiquifi - [www.abiquifi.org.br](http://www.abiquifi.org.br).

Tendo em vista a importância da produção de medicamentos no Brasil é de fundamental interesse a integração das universidades e indústrias, para o aproveitamento do conhecimento desenvolvido pelos pesquisadores nas universidades e maior eficiência na realização de pesquisas para obtenção de produtos demandados pelo mercado brasileiro. A universidade possui inestimável conhecimento nessa área que é desperdiçada por falta de mecanismos de aproximação com a indústria que, por sua vez, detém o conhecimento do processo produtivo.

## 2.7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

De acordo com o exposto na revisão bibliográfica, pode-se constatar que não existem muitas informações sobre o processo de separação da cef C, sendo que as informações disponíveis em patente são dispersas e pouco específicas. Além disso, as patentes relacionadas ao tema já possuem cerca de 30 anos, sendo que neste período ocorreram muitos avanços na área de extração e purificação de bioprodutos. Desta forma, justifica-se a importância do desenvolvimento deste trabalho, que foi propor a extração da cefamicina C do caldo filtrado por sistema de duas fases aquosas e re-extração e purificação por troca iônica em coluna de leito fixo.

## 2.8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIQUIFI - Associação Brasileira da Indústria Farmoquímica e de Insumos Farmacêuticos. ([www.abiquifi.org.br](http://www.abiquifi.org.br)), acessado em 20 de janeiro de 2013.

ALBERTSSON, P. A. Partitioning of cell particles and macromolecules (3. ed.). New York: John Wiley & Sons, 1986.

ANTONIO, T., Estudo da composição de meios de cultura para a produção de cefamicina C por *Streptomyces clavuligerus*, (Dissertação de Mestrado), Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, Instituto de Química de Araraquara, 58 p., 2007.

BAGGLEY 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.

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 Cephamicin C Purification Technique. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 166, p. 208-221, 2012a.

BAPTISTA NETO, A.; OLIVEIRA, J. H. H. L. ; BELLÃO, C.; BADINO, A. C. ; BARBOZA, M. ; BELLÃO, C. ; BARBOZA, M.; HOKKA, C. O. An alternative methodology for determination of cephamicin C from fermentation broth, *Journal of Chromatography and Separation Techniques*. 3 1-5, 2012b.

BARBOZA, M.; ALMEIDA. R.M.R.G., HOKKA, C.O. Influence of temperature on kinetics of adsorption and desorption of clavulanic acid by ionic exchange. *Biochemical Engineering Journal*, v.14, p.19-26, 2003.

BARBOZA, M.; ALMEIDA, R.M.R.G., HOKKA, C.O. Kinetic studies of clavulânico acid recovery by ion exchange. *Bioseparation*, v.10, p.221-227, 2002.

BELLÃO, C. Produção de cefamcina C por *Streptomyces clavuligerus* em batelada e batelada alimentada. São Carlos DEQ-UFSCar, (Tese de Doutorado), 2010.

BRITES, L. M. Separação e purificação do ácido clavulânico através de extração líquido-líquido seguida de adsorção em coluna de leito fixo. São Carlos DEQ- UFSCar, (Dissertação de Mestrado), 2005.

BROWN, A. C. et. al. Naturally occurring beta-lactamase inhibitors whith antibacterial activity. *Journal of Antibiotcs*, v. 29, p. 668-669,1976.

BROWN, H. D., GILES, M. A., CRAMER, B. H., NOBLE, B. H., NISBET, B. E., WEARE, T. G., et al., *Patente N° 4.378.920*. United State, 1983.

CURRAN, M.; SIMPSON, D.; PERRY, C. Ertapenem: a review of its use in the management of bacterial infections. *Drugs*.;63:1855-78, 2003.

DÉVI S.; SRIDHAR P., Optimization of critical parameters in immobilization of *Streptomyces clavuligerus* on alginate gel matrix for cephamycin C production. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 15 185-192, 1999.

DÉVI S.; SRIDHAR, P. Production of cephamycin C in repeated batch operations from immobilized *Streptomyces clavuligerus*. *Process Biochemistry*, 36, p. 225-231, 2000.

DUTTA, M.; DUTTA, N. N.; BHATTACHARYA, K. G. Aqueous phase adsorption of beta-lactam antibiotics onto polymeric resins and activated carbon. *Serapation Purification Technology*, v. 16, p. 213-224, 1999.

ELANDER, R. P. Industrial production of beta-lactam antibiotis. *Applies Microbiology Biotechnology* , 61, pp. 385-392, 2003.

ESMANHOTO, E.; KILIKIAN, B. V. ATPS applied to extraction of small molecules – polycetides – and simultaneous clarification of culture media with filamentous microorganisms. *Journal of Chromatography B*, v.807, p.139-143, 2004.

FRANCO, T. T.; KILIKIAN, B. V.; COIMBRA, J. S. R.; MEIRELLES, A. J. A. Extração líquido-líquido em sistemas de duas fases aquosas. In: Pessoa Jr. A.; Kilikian, B. V. *Purificação de produtos biotecnológicos*, 1ª ed. Barueri-SP, Manole, p. 114-165, 2005.

GHOSH, A. C.; BORA, M. M.; DUTTA, N. N. Development in Liquid Membrane Separation of Beta-Lactam Antibiotics. *Bioseparation*, v. 6, p. 91-105, 1996.

HELLINGER WC, BREWER NS. Carbapenems and monobactams: imipenem, meropenem, and aztreonam. *Mayo Clin Proc.*;p.74:420-34.1999.

HIRATA, B. D. Produção de ácido clavulânico em batelada alimentada por *Streptomyces clavuligerus* e extração em sistemas de duas fases aquosas. São Carlos DEQ-UFSCar, (Dissertação de Mestrado), 2003.

KAWAMURA, M. Y.; SHOJI, H. J.; MATSUMOTO, T. K. *Patente N° 4.256.835*. United States, 1981.

KAMIMURA, E. S.; MAUGERI FILHO, F. Cromatografia de Afinidade. In: Pessoa Jr. A.; Kilikian, B. V. *Purificação de Produtos Biotecnológicos*, 1ª ed. Barueri-SP, Manole, p. 231-247, 2005.

KAMOGASHIRA, T., TSUTOMU, N., SUGAWARA, M., NIHNO, T., TAKEGATA, S. *Patente N° 4.332.891*. United States, 1982.

KILIKIAN, B. V. Introdução à Cromatografia. In: Pessoa Jr. A.; Kilikian, B. V. *Purificação de Produtos Biotecnológicos*, 1ª ed. Barueri-SP, Manole, p. 166-175, 2005.

KILIKIAN, B. V.; PESSOA JR, A. Purificação de produtos biotecnológicos. In: Schmidell, W.; Lima, U. A.; Aquarone, E.; Borzani, W. *Biotecnologia Industrial. Engenharia Bioquímica*, 1ª ed. São Paulo, Edgard Blücher Ltda, v.2, p.493-514, 2005.

LEE, C.; SANDLER, S. I. Vancomycin partitioning in aqueous two-phase systems: effects of pH, salts, and affinity ligand. *Biotechnology and Bioengineering*, v.35, p.408-416, 1990.

LIRAS, P. Biosynthesis and molecular genetics of cephamycin. *Antonie van Leeuwenhoek*, 75, pp. 109-124, 1999.

MARSHALL, W. F.; BLAIR, J. E. The cephalosporins. *Mayo Clin Proc.*, 74:187-95, 1999.

MAUGERI FILHO, F.; TABOADA, O. M. Cromatografia de Interação Hidrofóbica. In: Pessoa Jr. A.; Kilikian, B. V. *Purificação de Produtos Biotecnológicos*, 1ª ed. Barueri-SP, Manole, p. 212-230, 2005.

MORAES, A. M.; ROSA, P. T. V. Cromatografia de exclusão molecular. In: Pessoa Jr. A.; Kilikian, B. V. *Purificação de Produtos Biotecnológicos*, 1ª ed. Barueri-SP, Manole, p. 176-195, 2005.

OMSTEAD, D. R.; HUNT, G. H.; BUCKLAND, B. C. - Commercial production of cephamycin antibiotics. In: Moo-Young, M. *Comprehensive biotechnology*, vol. 3 (The practice of biotechnology: current commodity products), cap. 9, p. 187, Pergamon Press Inc., USA, 1985.

PARADKAR, A. S.; AIDOO, K. A.; JUNSEN, S. E. - A pathway-specific transcriptional activator regulates late step of clavulanic acid biosynthesis in *Streptomyces clavuligerus*. *Molecular Microbiology*, 27 (4), pp. 831-843, 1998.

PARK, Y.S.; MOMOSE, I.; TSUNODA, K.; OKABE, M., Enhancement of Cephamicin C production using soybean oil as the sole carbon source. *Applied Microbiology and Biotechnology* 40 773-779, 1994.

PEREIRA, J. F. B., SANTOS, V. C., JOHANSSON, H. O., TEIXEIRA, J. A. C., PESSOA JR., A. A stable liquid-liquid extraction system for clavulanic acid using polymer-based aqueous two-phase systems. *Separation and Purification Technology*. V. 98, p. 441-450, 2012.

PESSOA Jr., A. Cromatografia de troca iônica. In: Pessoa Jr. A.; Kilikian, B. V. *Purificação de Produtos Biotecnológicos*, 1ª ed. Barueri-SP, Manole, p. 196-211, 2005.

PINES, M. H. *Patente N° 3.983.108*. United State, 1976.

PINOTTI, L. M.; FONSECA, L. P.; PRAZERES, D. M. F.; RODRIGUES, D. S.; NUCCI, E. R.; GIORDANO, R. L. C. Recovery and partial purification of penicillin G acylase from *E. coli* homogenate and *B. megaterium* culture medium using an expanded bed adsorption column. *Biochemical Engineering Journal*, v. 44, p. 11-118, 2009.

PORTO, T. S., MEDEIROS E SILVA, G. M., PORTO, C.S., CAVALCANTI, V., NETO, B.B., LIMA-FILHO, J.L., CONVERTI, A., PORTO, A.L.F., PESSOA JR. A. Liquid-liquid extraction of proteases from fermented broth by PEG/citrate aqueous two-phase system. *Chemical Engineering and Processing* 47, 716-721, 2008.

RAJU TN. The Nobel chronicles. 1945: Sir Alexander Fleming (1881-1955); Sir Ernst Boris Chain (1906-79); and Baron Howard Walter Florey (1898-1968). *Lancet*.; 353:936, 1999.

RIEDL, W.; RAISER, T. – Membrane-supported extraction of biomolecules with aqueous two-phase systems. *Desalination*, v. 224, p. 160-167, 2007.

RODRIGUEZ, G. Y.; Estudo da Cinética e do Equilíbrio da Adsorção da Cefamicina C em Resina de troca iônica e Simulação do Processo Contínuo. São Carlos: Dissertação de Mestrado, 2011.

ROLLINS, M. J., JESSEN, S. E., WOLFE, S., WESTALKE, D. W. Effect of aeration on antibiotic production by *Streptomyces clavuligerus*. *Journal Industrial Microbiology*, 3, pp. 357-364, 1998.

SARADA, I., SRIDHAR, P. Nutritional improvement of Cephamicin C fermentation using superior strain of *Streptomyces clavuligerus*. *Process Biochemistry*, 33 (3), pp. 317-322, 1998.

SARMENTO, M. J.; PIRES, M. J.; CABRAL, J. M. S.; AIRES-BARROS, M. R. Liquid-liquid extraction of a recombinant protein, cytochrome b5, with aqueous two-phase systems of polyethylene glycol and potassium phosphate salts. *Journal of Chromatography A*, v.668, p.117-120, 1994.

SCHUBERT, P. F. (1980). *Patente N° 4.196.285*. United States.

SHANG, Q.K.; LI, W.; JIA, Q.; LI D.Q. Partitioning behavior of amino acids in aqueous two-phase systems containing polyethylene glycol and phosphate buffer. *Fluid Phase Equilibria*, v. 219, p. 195–203, 2004.

SHIDHAR, P. Cephamycins, a important milestone in  $\beta$ -lactam. *Express Pharma Pulse*. 2002. Disponível em: [www.expresspharmapulse.com](http://www.expresspharmapulse.com) – Acesso em: 04 de março de 2012.

SILVA, C. S.; CUEL, M. F.; BARRETO, V. O.; KWONG, W. H.; HOKKA, C. O.; BARBOZA, M. Separation of clavulanic acid from fermented broth of amino acids by aqueous two-phase system and ion-exchange adsorption. *New Biotechnology*, v.29, n° 3, p. 428-431, 2012.

SILVA, G. M. ; MARQUES, D. A. V.; PORTO, T. S.; LIMA FILHO, J. L.; TEIXEIRA, J. A. C.; PESSOA Jr., A. ; PORTO, A. L. F. Extração of fibrinolytic proteases from *Streptomyces sp.* DPUA 1576 using PEG-phosphate aqueous two-phase systems. *Fluid Phase Equilibria*, v. 339, p. 52-57, 2013.

STAPLEY, E. O.; JACKSON, M.; HERNANDEZ, S.; ZIMMERMAN, S. B.; CURRIE, S. A.; MOCHALES, S.; MATA, J. M.; WOODRUFF, H. B.; HENDLIN, D. - Cephamycins, a new family of  $\beta$ -lactam antibiotics. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2, 122-131, 1972.

VASILIU, S.; BUNIA, I.; RACOVITA, S.; NEAGU, V. Adsorption of cefotaxime sodium salt on polymer coated ion exchange resin microparticles: Kinetics, equilibrium and thermodynamic studies. *Carbohydrate Polymers*, v. 85 p. 376-387, 2011.

VIDEIRA, M. e AIRES-BARROS, M. R. - Liquid-liquid extraction of clavulanic acid using an aqueous two-phase system of polyethylene glycol and potassium phosphate. *Journal of Chromatography A*, v. 668, pp. 237-240, 1994.

WILLIAMS, J.D.  $\beta$ -lactamases and  $\beta$ -lactamase inhibitors. *Inter. J. Antimicrob. Agents*, 12: 3-7, 1999.

WRIGHT, A. J. The penicillins. *Mayo Clin Proc.*, 74:290-307, 1999.

YANG, W.; CHU, I. Extraction of penicillin-g by aqueous two-phase partition. *Biotechnology Techniques*, v.4, p.191-194, 1990.

YANG, W.; LIN, C.; CHU, I.; LEE, C. Extraction of cephalosporin C from whole broth and separation of desacetyl cephalosporin c by aqueous two-phase partition. *Biotechnology and Bioengineering*, v.43, p.439-445, 1994.

# **CAPÍTULO 3**

---

**Estudo cinético da  
degradação da cefamicina C**

## Estudo cinético da degradação da cefamicina C

**RESUMO** – A cefamicina C é um antibiótico  $\beta$ -lactâmico pertencente à classe das cefalosporinas. Este composto destaca-se das demais cefalosporinas pela sua resistência à ação das  $\beta$ -lactamases, que são produzidas por micro-organismos patogênicos e que representa um dos principais mecanismos de resistência bacteriana aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos. A cefamicina C pode ser produzida por cultivos da bactéria *Streptomyces clavuligerus* em processos submersos aerados. No desenvolvimento do processo de produção e purificação, o conhecimento da sua estabilidade é de grande importância, tendo em vista permitir o estabelecimento de condições que minimizem as perdas e aumentem o rendimento do processo global. Assim, neste trabalho foi estudada a estabilidade da cefamicina C sob os valores de pH assumidos de 2,2; 3,3, 5,0, 6,0; 7,0; 7,6 e 8,7 a uma temperatura de 20 °C. Nos ensaios foram utilizados caldos de cultivo de *S. clavuligerus*, tamponados para a manutenção do pH e submetidos a um sistema de filtração tangencial em membranas de ultrafiltração, com tamanho de poros de 3 kDa. Observou-se que a constante de hidrólise apresenta maiores valores nos extremos das regiões ácidas e básicas, enquanto que em valores de pHs próximos à neutralidade este coeficiente apresentou valor menor, indicando que os processos devem ser estabelecidos nesta região. Se for necessário operar nas regiões extremas de pH, estas operações devem ocorrer em um curto período de tempo. O menor valor de meia vida foi de 52,6 horas e foi verificado para o pH de 8,7 enquanto que o maior valor de meia vida foi de 459 horas para um pH de 6,0; para o pH mais ácido de 2,2 o valor de meia vida foi de 118,6 horas.

**PALAVRAS-CHAVE:** antibiótico, cefamicina C e degradação.

### 3.1 INTRODUÇÃO

Os antibióticos  $\beta$ -lactâmicos pertencem a uma classe de antibióticos cujas propriedades dos medicamentos são conhecidos de longa data. Desde a descoberta da penicilina por Fleming, em 1929, vários compostos desta família foram isolados e têm sido bastante empregados no combate de infecções bacterianas (DEMAIN, 2006). Os  $\beta$ -lactâmicos são peptídeos modificados e atuam nas enzimas responsáveis pela síntese do peptídeoglicano da parede celular das bactérias, afetando a integridade celular (LIRAS, 1999). No mercado global de antibióticos, ocupam posição de grande destaque. Entre 2001 e 2005, as penicilinas e cefalosporinas dominaram o mercado, correspondendo, respectivamente, a 17 e 27% do total das vendas (KRESSE, BELSEY e ROVINI, 2007).

A cefamicina C pertence à classe das cefalosporinas e é considerada uma cefalosporina modificada devido à presença de um grupo metoxila ligado ao anel  $\beta$ -lactâmico, o que lhe confere uma maior estabilidade à ação das  $\beta$ -lactamases (DEMAIN e ELANDER, 1999). As  $\beta$ -lactamases são enzimas produzidas por bactérias que clivam o anel  $\beta$ -lactâmico do antibiótico, liberando um composto sem atividade bactericida. A produção destas  $\beta$ -lactamases representa um dos principais mecanismos de resistência bacteriana aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, e por isso a cef C se destaca das demais cefalosporinas por apresentar uma maior estabilidade à ação dessas enzimas (BAGGALEY et al., 1997). A cef C não é comercializada diretamente como antibiótico, e sim como matéria-prima para a produção de antibióticos semi-sintéticos, como a cefoxitina e o cefotetan.

A cefamicina C é produzida por meio de cultivos submersos aerados pelas bactérias *Streptomyces clavuligerus* e *Nocardia lactamdurans* (LIRAS, 1999). Ao final do cultivo, o caldo de fermentação deve ser processado, de forma a extrair e isolar este composto dos demais componentes do caldo.

Assim como a cefalosporina C, a molécula de cefamicina apresenta pelo menos três grupos susceptíveis a ataques por íons hidrogênio, hidroxila e água: o anel  $\beta$ -lactâmico, o grupo éster da cadeia lateral acetil, e o grupo amida da cadeia lateral  $\alpha$ -aminoadipil (KONECNY, FELDER e GRUNER, 1973). Os mecanismos das reações de decomposição são complexos e vão depender da concentração dos íons hidrogênio e hidroxila presentes na solução, ou seja, do pH desta solução. Na indústria, o conhecimento da cinética de hidrólise para a cef C é de fundamental importância para estabelecer as condições de processamento, de

forma a reduzir as perdas devido à degradação. Assim, o presente trabalho teve como objetivo estudar a cinética de hidrólise da cef C em diferentes valores de pH.

## 3.2 MATERIAL E MÉTODOS

### 3.2.1 Tratamento do caldo fermentado

Na realização dos experimentos foram utilizados caldos oriundos de cultivos de *Streptomyces clavuligerus* DSM 41826, os quais foram cultivados no Laboratório de Bioquímica do Departamento de Engenharia Química (DEQ/UFSCar). O meio de cultura foi composto essencialmente por derivados de soja e lisina como fonte de nitrogênio, e glicerol como fonte de carbono e energia (BELLÃO, BATISTA NETO e BADINO, 2007).

O caldo fermentado foi mantido congelado a -80 °C e, o caldo foi centrifugado e então submetido aos processos de microfiltração e ultrafiltração com escoamento tangencial, tal como descrito por Silva et al. (2009). A microfiltração foi feita através de membrana tubular de Polisulfona, com 0,22 µm de tamanho de poro (CFP-2-E-8A) e, a ultrafiltração, do permeado microfiltrado, foi feita em membrana tubular de Polisulfona com 3KDa de tamanho de poro (UFP-3-E-3MA), ambas fornecidas pela GE.

### 3.2.2 Determinação da concentração de cefamicina c

A concentração de cef C foi determinada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), por meio da metodologia desenvolvida no DEQ/UFSCar, na qual é utilizada a coluna Sinergy MAX RP 12 da Phenomenex como fase estacionária, e solução de ácido acético 0,01M como fase móvel a uma vazão de 2 mL.min<sup>-1</sup>. A temperatura da separação foi de 28 °C e os picos detectados no comprimento de onda de 254 nm. A curva de calibração foi obtida através da injeção vários valores da amostra cuja concentração de antibiótico foi determinada por bioensaio (BATISTA NETO et al., 2012).

## 3.3 Procedimento experimental

Os estudos cinéticos de hidrólise da cef C em solução aquosa foram realizados à temperatura constante de 20 °C, visando tornar o processo de refrigeração menos oneroso.

Nestes experimentos foram avaliados os seguintes pHs: 2,2, 3,3, 5,0, 6,0, 7,0, 7,6 e 8,7. Na Tabela 3.1 são apresentados os pHs utilizados e os seus respectivos tampões. Os tampões foram preparados de acordo com Villela et al. (1973).

**Tabela 3.1 – Soluções tampão a diferentes valores de pHs utilizadas nos experimentos de hidrólise da cefamicina C.**

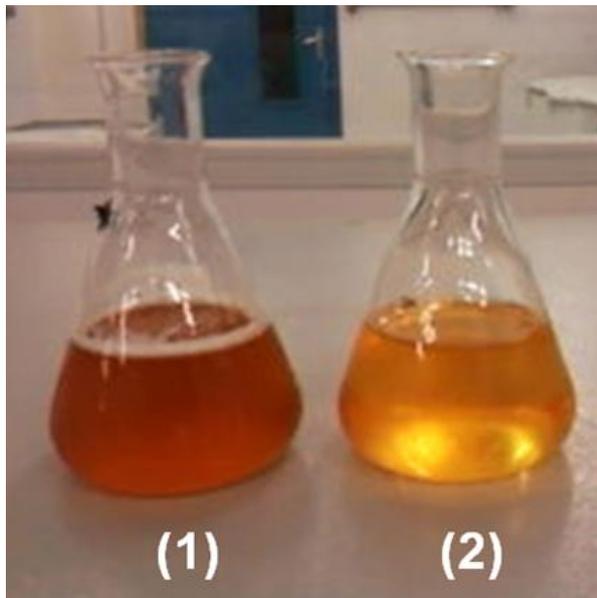
<b>Tampão</b>	<b>Volumes das soluções para preparar 100 mL de tampão</b>	<b>pH</b>
HCl/KCl	3,35 mL de HCl (0,2 M) + 1,8488 g KCl	2,2
Citrato-fosfato	37,7 mL de Ác. Cítrico (0,1 M) + 12,3 mL de Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (0,2 M)	3,3
Citrato-fosfato	24,3 mL de Ác. Cítrico (0,1 M) + 25,7 mL de Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (0,2M)	5,0
Fosfato	87,7 mL de NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (0,2 M) + 12,3 mL de Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (0,2 M)	6,0
Fosfato	39,0 mL de NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (0,2 M) + 61,0 mL de Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (0,2 M)	7,0
Fosfato	13,0 mL de NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (0,2 M) + 87,0 mL de Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (0,2 M)	7,6
Bicarbonato-carbonato	27,5 mL de Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (0,2M) +22,5 mL de NaHCO <sub>3</sub> (0,2 M)	8,7

O caldo e a solução tampão foram misturados na proporção 2:3 (v/v), e em seguida filtrados em membrana de mistura de ésteres estéril de 0,22 µm. Porções de 50 mL do caldo esterilizado foram transferidas para Erlenmeyers de 150 mL e, posteriormente, incubadas em mesas incubadoras rotativas, sem agitação, à temperatura de 20 °C. Amostras do caldo foram retiradas, em tempos pré-determinados, para realização de análise de cef C.

### 3.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O tratamento de centrifugação e filtração promoveu a remoção das células e sólidos insolúveis do caldo, deixando-o em condição adequada para realização dos estudos cinéticos de hidrólise. Na Figura 3.1 pode-se observar diferença de turbidez do caldo fermentado, após os tratamentos de microfiltração e ultrafiltração.

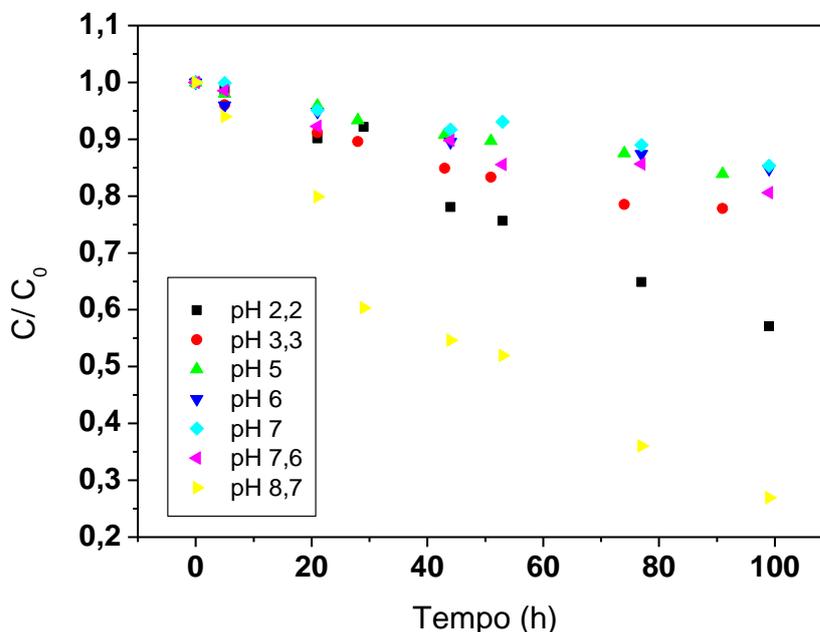
**Figura 3.1 – Diferença de turbidez do caldo fermentado contendo cefamicina C, após os processos de microfiltração (1) e ultrafiltração (2).**



Após a análise dos experimentos realizados, visando avaliar os parâmetros cinéticos envolvidos no mecanismo de degradação da cef C, sob diferentes condições de pH, verificou-se que as condições mais severas para o antibiótico, observadas em função das constantes de hidrólise obtidas, foram em soluções aquosas de pH extremos, ou seja, 2,2 e 8,7. Em solução ácida de pH 2,2; houve uma degradação de 46% de cef C, em relação à concentração inicial. Enquanto que em solução básica pH de 8,7, a degradação foi mais intensa, alcançando 71% de degradação. Nos valores de pHs intermediários, a cef C mostrou-se menos susceptível ao ataque hidrogeniônico e apresentando portanto uma degradação inferior a 20%.

Na Figura 3.2 são apresentadas as curvas cinéticas de degradação para os diferentes pHs avaliados, obtidas devido ao processo de hidrólise da cef C.

Figura 3.2 – Curvas cinéticas de degradação da cefamicina C em função do tempo, para os diferentes pHs (2,2; 3,3, 5,0, 6,0; 7,0; 7,6 e 8,7).



Com os resultados experimentais obtidos foi ajustado ao modelo cinético de pseudo primeira ordem, descrito pela Equação 1.

$$\frac{dC}{dt} = -k_H C \quad (1)$$

em que C é a concentração de cef C no tempo t e  $k_H$  a constante cinética de hidrólise da reação.

Após a integração e linearização da equação 1, obtém-se a equação 2, à qual os dados experimentais foram ajustados para determinação do  $k_H$  em cada pH analisado.

$$-\ln\left(\frac{C}{C_0}\right) = k_H t \quad (2)$$

em que  $C_0$  é a concentração inicial de cef C.

A constante cinética de hidrólise ( $k_H$ ) foi estimada pelo método clássico da regressão linear, a 95% de grau de confiança. Nas Figura 3.3 a Figura 3.9 são mostrados os ajustes obtidos, para cada valor de pH.

Figura 3.3 - Ajuste dos dados experimentais do processo de degradação da cefamicina C ao modelo de cinética de degradação de primeira ordem para pH 2,2.

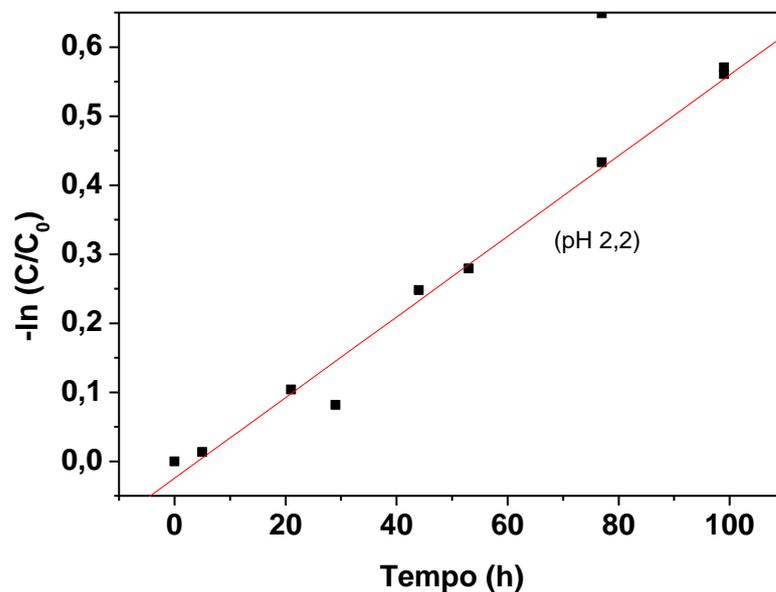


Figura 3.4 - Ajuste dos dados experimentais do processo de degradação da cefamicina C ao modelo de cinética de degradação de primeira ordem para pH 3,3.

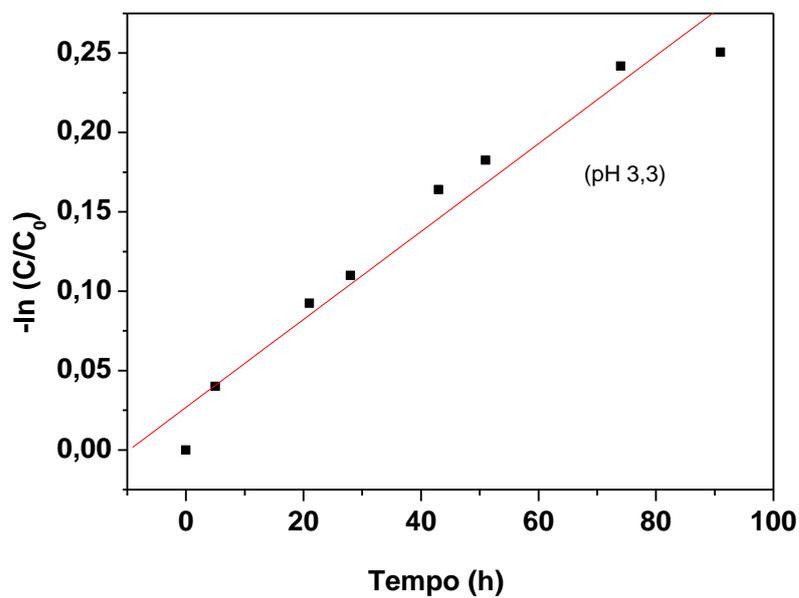


Figura 3.5 - Ajuste dos dados experimentais do processo de degradação da cefamicina C ao modelo de cinética de degradação de primeira ordem para pH 5,0.

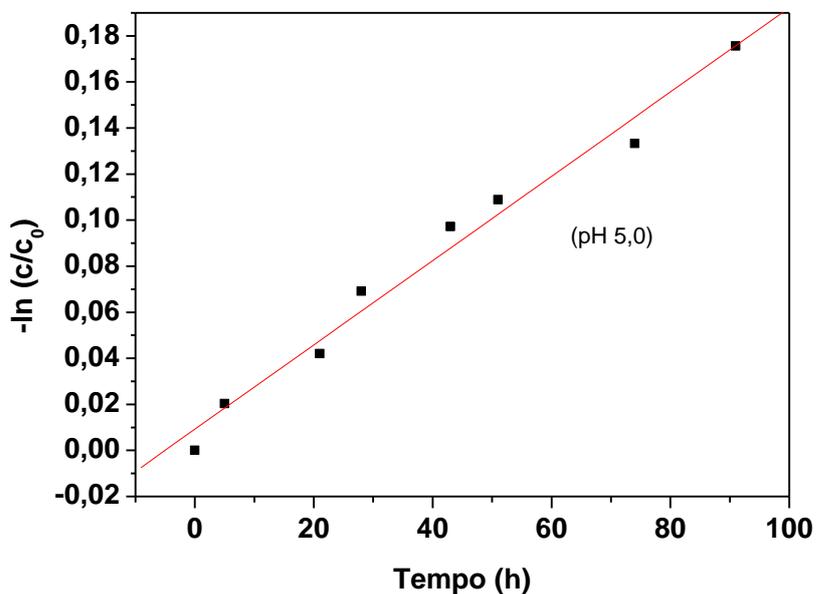


Figura 3.6 - Ajuste dos dados experimentais do processo de degradação da cefamicina C ao modelo de cinética de degradação de primeira ordem para pH 6,0.

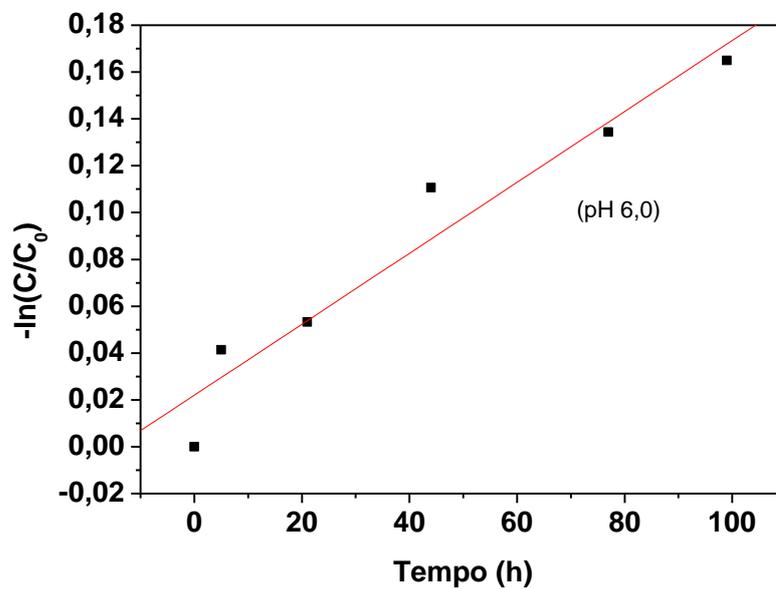


Figura 3.7 - Ajuste dos dados experimentais do processo de degradação da cefamicina C ao modelo de cinética de degradação de primeira ordem para pH 7,0.

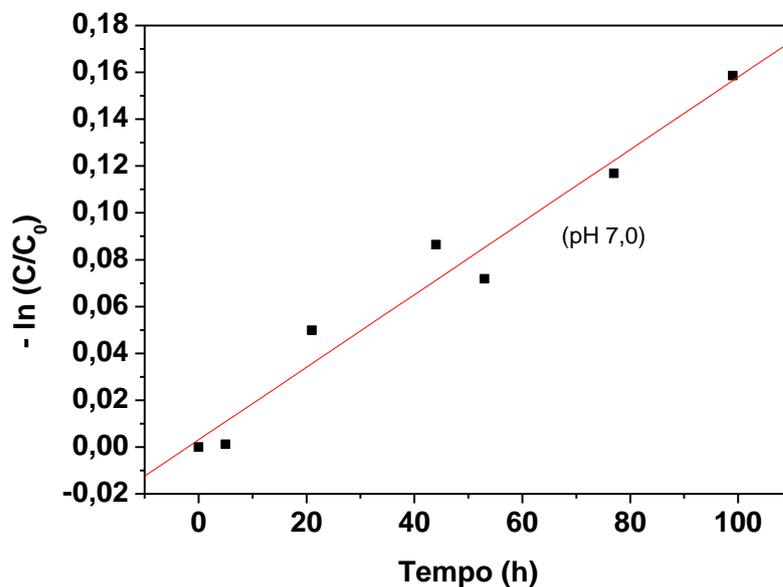


Figura 3.8 - Ajuste dos dados experimentais do processo de degradação da cefamicina C ao modelo de cinética de degradação de primeira ordem para pH 7,6.

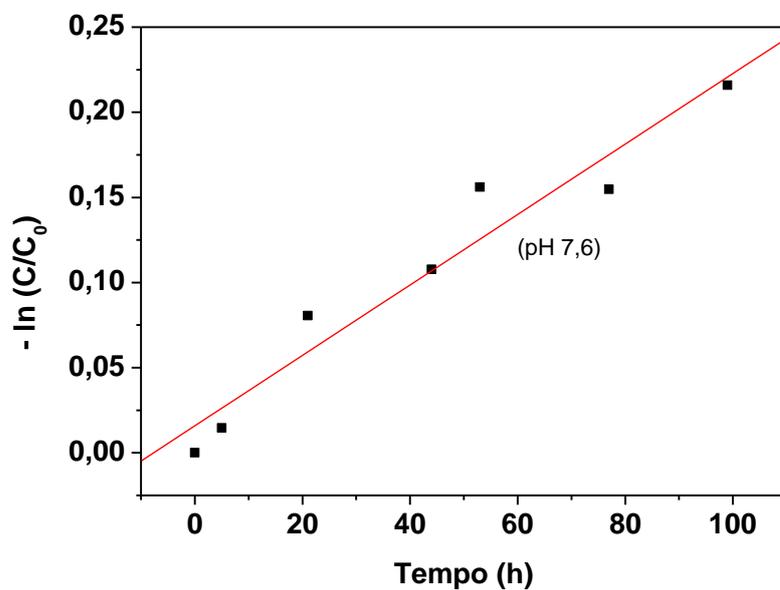
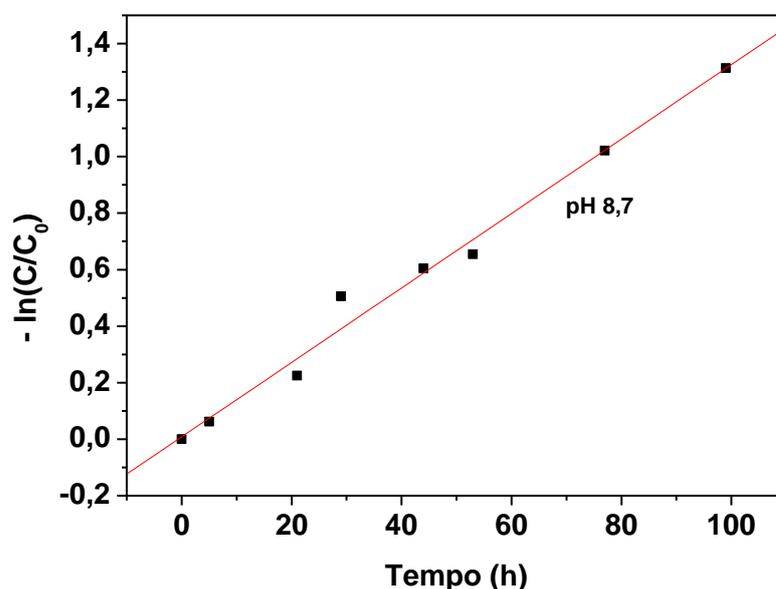


Figura 3.9 - Ajuste dos dados experimentais do processo de degradação da cefamicina C ao modelo de cinética de degradação de primeira ordem para pH 8,7.



A partir dos valores de  $k_H$  obtidos e utilizando-se a Equação 2, calculou-se a meia vida da cef C, em cada pH avaliado. Estes valores são apresentados na Tabela 3.2.

Tabela 3.2 - Valores das constantes cinéticas de hidrólise ( $k_H$ ) e meia vida para a cefamicina C, em soluções aquosas a 20 °C.

pH	Constante cinéticas de hidrólise - $k_H$ ( $h^{-1}$ )	$R^2$	Meia vida (h)
2,2	$0,00584 \pm 0,00031$	0,99	118,6
3,3	$0,00277 \pm 0,00022$	0,98	250,2
5,0	$0,00183 \pm 0,00010$	0,99	378,7
6,0	$0,00151 \pm 0,00019$	0,96	459,0
7,0	$0,00155 \pm 0,00013$	0,98	447,1
7,6	$0,00207 \pm 0,00023$	0,96	334,8
8,7	$0,01317 \pm 0,00063$	0,99	52,6

O menor valor de constante cinética de hidrólise ( $0,00151 \pm 0,00019 \text{ h}^{-1}$ ) e maior valor meia vida (459,0 horas) foram obtidos em pH 6,0.

Avaliando os valores de  $k_H$  e meia vida da cef C nos diferentes valores de pH avaliados, verificou-se maior estabilidade do antibiótico quando em meio ácido.

Comparando os valores obtidos com outros antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, as cefalosporinas possuem uma cinética de hidrólise muito mais lenta. O ácido clavulânico, em pHs de 6,0 e 7,0, a 20°C, possui valores de  $k_H$  de 0,02186 e 0,02397 ( $\text{h}^{-1}$ ), respectivamente, cerca de dez vezes maior que o da cef C (BERSANETTI et al., 2005).

Konecny, Felber e Gruner (1973) obtiveram constantes de hidrólise da cefalosporina C semelhantes às obtidas para a cef C, na mesma ordem de grandeza. Para os valores de pHs básicos as constantes de hidrólise da cef C e da cefalosporina C são muito semelhantes, de  $0,0131(\text{h}^{-1})$  e  $0,0130(\text{h}^{-1})$ , nos pHs de 8,7 e 8,9, respectivamente.

Neste mesmo trabalho, Konecny, Felber e Gruner (1973) propuseram um modelo que relaciona a constante de hidrólise  $k_H$  com o pH do meio. O comportamento observado de  $k_H$  em função do pH é característico de reações susceptíveis à catálise ácido-base específica, sendo observado também, para o ácido clavulânico, além da cefalosporina (BERSANETTI et al., 2005). O modelo é representado pela Equação 3.

$$k_H = k_a [H^+] + k_n + k_b [OH^-] \quad (3)$$

em que  $k_a$  e  $k_b$  são as constantes parciais de hidrólise em meios ácido e básico, respectivamente.

Para verificar se a cef C segue o comportamento previsto por este modelo, foi realizado um ajuste dos valores de  $k_H$ , estimados em função das concentrações de  $H^+$  e  $OH^-$ . A estimativa foi feita através de regressão multilinear, pelo procedimento de Levenberg-Marquardt, com 95% de nível de confiança. Os valores das constantes parciais de hidrólise estimados estão apresentados na Tabela 3.3, que também apresenta os valores para cefalosporina C e ácido clavulânico, (KONECNY, FELBER e GRUNER; 1973; BERSANETTI et al.; 2005).

A partir da Figura 3.10, observa-se que houve um bom ajuste do modelo aos valores experimentais obtidos de  $k_H$  e um alto valor do coeficiente de correlação (R), ou seja, o modelo explica bem o comportamento observado para a constante de hidrólise da cef C, na faixa de pH estudada.

Figura 3.10 - Constantes globais de hidrólise da cefamicina C em função do pH, a 20 °C.

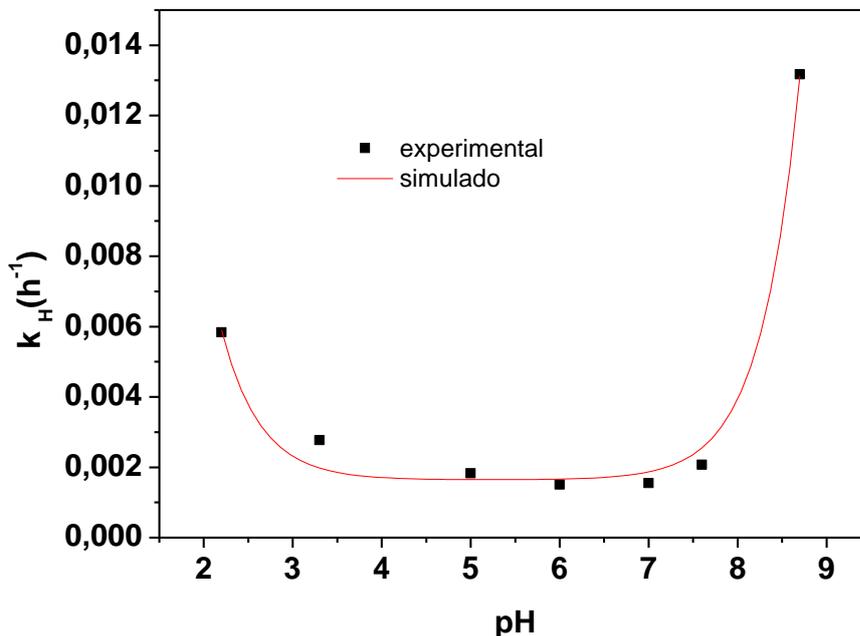


Tabela 3.3 - Valores das constantes parciais de hidrólise da cef C, cefalosporina C e ácido clavulânico em solução aquosa.

Constantes (L.mol <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )	Valor estimado		
	Cefamicina C	Cefalosporina C (Konecny, Felber e Gruner; 1973)	Ácido Clavulânico (Bersanetti et al.; 2005)
$k_a$	$0,66971 \pm 0,09711$	0,27	$69,0844 \pm 0,7343$
$k_n$	$0,00166 \pm 0,00025$	0,005	$0,0057 \pm 0,0014$
$k_b$	$2287,29 \pm 123,0642$	500	$2928,2164 \pm 31,5393$
	$R^2=0,99$		

Analisando os valores das constantes parciais obtidas, observou-se que a velocidade de degradação da cef C em meio básico é maior do que em meios ácidos. Essa maior susceptibilidade à hidrólise alcalina foi verificada também pelos trabalhos de Okamoto et al. (1996), que estudaram a hidrólise de cefdinir, uma cefalosporina semi-sintética oral, e por Konecny et al. (1973), com cefalosporina C.

Na Figura 3.10 nota-se que a faixa de pH de maior estabilidade da cef C está situada entre 3 e 7,5, que se aproxima muito da faixa de maior estabilidade encontrada por Konecny et al. (1973) para a cefalosporina C, que foi na faixa de pH entre 3 e 7. Segundo estes autores,

nesta região, a principal reação de degradação é o ataque água ao núcleo  $\beta$ -lactâmico. Já na região de maior acidez, a reação de lise do núcleo é superada pela desacetilação, sendo que esta última leva à formação de desacetilcefalosporina C, convertida em seguida à lactona. Na região de pH mais alcalino também ocorre a desacetilação e a destruição do núcleo, sendo que a primeira é quatro vezes mais rápida que a segunda. Possivelmente, o mesmo ocorre com a cef C, já que ambos possuem comportamentos semelhante de  $k_H$  em função do pH. Levando-se em consideração o baixo valor de  $k_n$ , comparado aos valores de  $k_a$  e  $k_b$ , a reação de lise do anel  $\beta$ -lactâmico pela água é uma reação muito mais lenta que as reações de degradação catalisadas por ácido ou base. Possivelmente, a reação de desacetilação é a principal responsável pela degradação da cef C em meios muito ácidos ou muito básicos.

Apesar das diferenças nas estruturas moleculares entre a cef C e a cefalosporina C, onde a cefamicina C apresenta no C7 uma metoxila no lugar do hidrogênio presente na cefalosporina C, a presença deste grupo atua como estabilizador da estrutura do anel  $\beta$ -lactâmico, as quais são responsáveis pela maior resistência às  $\beta$ -lactamases, os resultados obtidos mostraram que ambas possuem estabilidade semelhante em solução aquosa, mesmo sob diferentes valores de pH. Em vista disso, no que se refere aos processos de produção e purificação, estes não serão limitados por operações que exijam extremos de condições de pH, visto que apesar de apresentar limites de valores de pH onde sua estabilidade é maior, mesmo nas regiões extremas a velocidade de degradação é baixa, conforme indicado pelos valores de meia vida. Esta característica, portanto, conduz que os processos de extração e purificação deverão se basear em aspectos físico-químicos, não sendo limitados à condições extremas de pH sendo que é a presença de um grupo metoxila ligado ao anel  $\beta$ -lactâmico que poderá diferenciar as etapas de downstream quando comparada com a cefalosporina C.

### 3.5 CONCLUSÃO

Os experimentos realizados mostraram que a cefamicina C apresentou os melhores resultados de constante cinética de hidrólise ( $0,00151 \pm 0,00019 \text{ h}^{-1}$ ) e meia vida (459,0 h) quando em solução aquosa em pH 6,0. A cefamicina C mostrou-se bastante estável em uma ampla faixa de pH (3,0 a 7,5), apresentando maiores taxas de degradação apenas em valores de pHs, ácidos (pH<3) ou básicos (pH>7,5). Esta característica representa uma vantagem do ponto de vista industrial, já que permite uma maior flexibilização das condições do processo de produção e purificação do composto.

### 3.6 REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

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.

BAPTISTA NETO, A.; OLIVEIRA, J. H. H. L.; 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*. 3 1-5, 2012.

BELLÃO, C.; BAPTISTA NETO, A.; BADINO JR, A. C. Avaliação de meios de Cultura para a Produção de Cefamicina C por *Streptomyces clavuligerus* em Batelada. *anais do XVI Simpósio Nacional de Bioprocessos*. Curitiba-PR, 2007.

BERSANETTI, P. A.; ALMEIDA, R. M. R. G.; BARBOZA, M.; ARAÚJO, M. L. G. C.; HOKKA, C. O. Kinetic studies on clavulanic acid degradation. *Biochemical Engineering Journal*, v. 23, p. 31-36, 2005.

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

DEMAIN, A.L. From natural products discovery to commercialization: a success story. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, v. 33, p. 486-495, 2006.

KONECNY, J.; FELBER, E.; GRUNER, J. Kinetics of hydrolysis of cephalosporin C. *The Journal of Antibiotics*, v. 26, p. 135-141, 1973.

KRESSE, H.; BELSEY, M. J.; ROVINI, H. The antibacterial drugs market. *Natura Reviews Drug Discovery*, v.6, p.19-20, 2007.

LIRAS, P. Biosynthesis and molecular genetics of cephamycins. *Antonie van Leeuwenhoek*, v.75, p.109-124, 1999.

OKAMOTO, Y.; KIRIYAMA, K.; NAMIKI, Y.; MATSUSHITA, J.; FUJIOKA, M.; YASUDA, T. Degradation kinetics and isomerization of cefdinir: a new oral cephalosporin in aqueous solution. *J. of Pharmaceutical Sciences*, v. 85, p. 976-983, 1996.

SILVA, C. S.; RODRIGUES, Y.R.; HOKKA, C.O.; BARBOZA, M. Study of Fouling Index in Tangential Filtration Applied for Separation of Clavulanic Acid from Fermentation Broths. In: Antonio Mendez-Vilas. (Org.). *Current Research Topics in Applied Microbiology and*

Microbial Biotechnology. World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd., Sevilha, pp. 765-777, 2009.

VILLELA, G. G.; BACILA, M.; TASTALDI, H. Tecnicas e experimentos de bioquimica. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 28-31, 1973.

.

# **CAPÍTULO 4**

---

**Separação da cefamicina C  
de aminoácidos por sistema  
de duas fases aquosas**

## **Separação da cefamicina C de aminoácidos por sistema de duas fases aquosas**

**RESUMO** – Neste trabalho foram realizados estudos que visaram promover a separação do antibiótico cefamicina C (cef C) e de aminoácidos a partir de caldo fermentado, utilizando-se o sistema de duas fases aquosas (SDFa), composto por polietileno glicol (PEG) e fosfato de potássio. O caldo utilizado foi resultado de um cultivo com *Streptomyces clavuligerus* DSM 41826 em biorreator agitado e aerado, em meio de cultura complexo contendo derivados de soja e lisina como fonte de nitrogênio, e glicerol como fonte de carbono e energia. A partir do mosto realizaram-se etapas de separação primária constando de microfiltração e ultrafiltração do caldo. Devido a complexidade do meio de cultura é comum se encontrar aminoácidos residuais ou não assimiláveis, desta forma verificou-se a presença de subprodutos de baixo peso molecular, como os aminoácidos: ornitina, lisina e asparagina. O sistema de duas fases aquosas composto por PEG e fosfato, tem potencial em extrair aminoácidos de soluções, assim, concebeu-se a hipótese de utilizar esta técnica para realizar a separação entre estes aminoácidos e a cefamicina C. Na primeira parte deste trabalho foram realizados experimentos variando-se os seguintes parâmetros: massa molecular de PEG (400, 600, 1000 e 4000), pH (6, 7 e 8), tamanho de *tie-line* (TLL – 37 e 43) e razão de volume entre as fases (rTLL - 0,75, 1,00 e 1,25), de modo a possibilitar a determinação do melhor sistema para a extração da cef C. Verificou-se que o maior coeficiente de partição ( $k_p=5,57$ ) foi obtido no seguinte sistema: pH 8,0, PEG 400, TLL 43 e rTLL 1,00. Na etapa seguinte, utilizando-se o melhor sistema definido, foram avaliados o fator de purificação (FP), eficiência de separação (ES) e fator de concentração (FC) da cef C, em relação aos aminoácidos. Diante dos resultados obtidos, concluiu-se que o  $k_p$  aumentou com a diminuição da massa molecular de PEG. Em relação ao pH, os maiores valores de  $k_p$  foram obtidos em meios mais alcalinos, pois a cef C apresenta maior hidrofobicidade nestas condições.

**PALAVRAS-CHAVE:** sistema de duas fases aquosas, separação, cefamicina C e aminoácidos.

## 4.1 INTRODUÇÃO

A cefamicina C (cef C) é um antibiótico  $\beta$ -lactâmico, produzido por meio de cultivos submersos aerados pelo *Streptomyces clavuligerus* (STAPLEY et al., 1972). As cefamicinas foram isoladas no começo dos anos 70 pelas empresas Merck e Eli Lilly. O primeiro membro desta família a ser isolado foi a cef C, produzida por *Nocardia lactamdurans* e *Streptomyces clavuligerus* (OMSTEAD et al., 1985).

O desenvolvimento dos Sistemas de Duas Fases Aquosas (SDFA) aplicados às extrações líquido-líquido para operação em grande escala é amplamente estudado para a composição PEG/dextrana e PEG/sal (fosfato, citrato ou sulfato), pois apresentam uma série de vantagens quando comparados a outros métodos de separação, como os de cromatografia de exclusão molecular e troca iônica. Dentre estas vantagens, destacam-se o baixo custo de seus componentes, atoxicidade, grande faixa de aplicação e menor tempo de separação (SARMENTO et al., 1994).

Bora et al. (2005) realizaram o estudo da separação de cefalosporinas (cefalotin, cefalosporina C, cefalexin, cefazoline, cefataxim, cefadroxil) em SDFA, utilizando PEG/fosfato e PEG/sulfato, visando avaliar o efeito da natureza química do soluto na separação, em termos de valores de hidrofobicidade. Os resultados mostraram que o coeficiente de partição ( $k_p$ ) está relacionado à estrutura molecular do soluto, ou seja, o seu aumento é proporcional ao maior número de carbonos presentes nos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos estudados. Em relação à concentração, os autores obtiveram a maior extração dos compostos na concentração de 20% de sal e PEG. O melhor pH foi 8,0 para a extração do antibiótico, obtendo valores de coeficientes de partição em torno de 5.

Silva et al. (2008) realizaram o estudo dos efeitos das variáveis envolvidas na purificação de ácido clavulânico (AC) em SDFA composto por PEG/sal de fosfato. Os experimentos foram realizados variando os seguintes parâmetros: massa molecular de PEG (600, 1000 e 4000), pH (6,5; 7 e 7,5), temperatura (20, 25 e 30 °C), tamanho da *tie-line* (TLL – 37, 43 e 49) e razão de volume das fases (rTLL - 0,75, 1,00 e 1,25). Os resultados mostraram que, no intervalo testado, os parâmetros, massa molecular do PEG, tamanho da *tie-line* e razão de volume das fases, tiveram grande efeito sobre o rendimento e o coeficiente de partição. As melhores condições, obtidas por método estatístico de otimização multivariável, definiram as regiões de baixa massa molecular (PEG 400), com pH 6,4, tamanho de *tie line*

(TLL) de 42 e no maior volume de fase superior (rTLL) de 1,3. Nestas condições o rendimento obtido foi de 100% e o fator de purificação de 1,5.

Shang et al. (2004) estudaram o comportamento de 4 aminoácidos (cisteína, fenilalanina, metionina e lisina) em 15 SDFA, compostos por PEG/fosfato. A partir dos resultados obtidos, verificou-se que as estruturas das cadeias laterais dos aminoácidos têm uma influência significativa na partição em SDFA, e os dois principais fatores que afetaram a separação foram as interações eletrostáticas e hidrofobicidade. Percebeu-se que o coeficiente de partição dos aminoácidos aumentou com o aumento do pH, massa molecular do PEG e razão de volume das fases. Os maiores valores de coeficiente de partição obtidos foram: 2,53 (cisteína), 2,59 (fenilalanina), 1,19 (metionina) e 0,96 (lisina).

Neste trabalho estudou-se a separação da cef C do caldo fermentado, por sistema de duas fases aquosas, composto por polietileno glicol (PEG) e fosfato de potássio. Na primeira etapa do trabalho foi investigada a influência das variáveis: massa molecular do PEG, pH, tamanho de *tie-line* (TLL) e razão de volume das fases (rTLL), sobre o coeficiente de partição da cef C. Na segunda etapa, o sistema foi aplicado para a separação da cef C dos aminoácidos ainda presentes no caldo ultrafiltrado, utilizando-se o melhor sistema determinado na etapa anterior.

## 4.2 MATERIAS E MÉTODOS

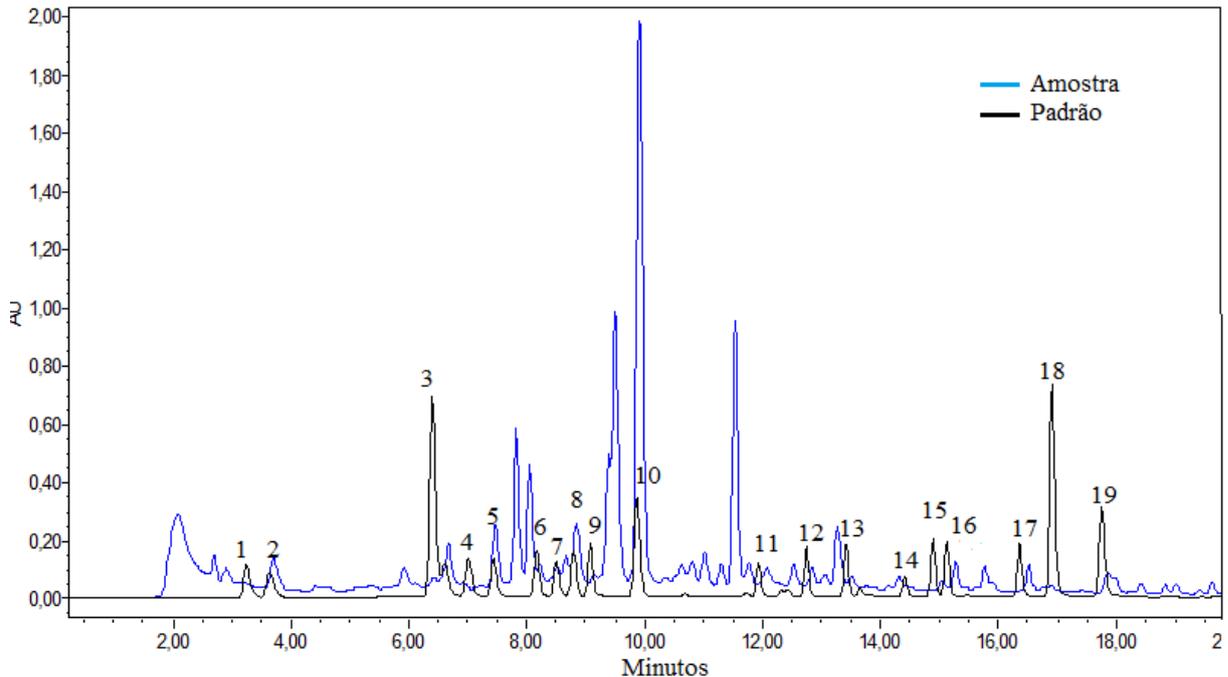
### 4.2.1 Tratamento do caldo fermentado

O caldo utilizado foi produzido pelo micro-organismo *Streptomyces clavuligerus* DSM 41826, em meio complexo contendo derivados de soja e lisina como fonte de nitrogênio, e glicerol como fonte de carbono e energia. A fermentação ocorreu em biorreator de bancada de 5 litros, modelo Bioflo III da New Brunswick Co., provido de sistemas de controle de temperatura, pH e concentração de O<sub>2</sub> dissolvido (BELLÃO, BATISTA NETO e BADINO, 2007).

O caldo inicialmente foi centrifugado e em seguida submetido à etapa de purificação primária composta pelas operações de microfiltração e ultrafiltração, de acordo com o processo proposto por Silva et al. (2009). A microfiltração foi realizada em membrana tubular, com tamanho de poro de 0,22 µm, modelo CFP-2-E-8<sup>a</sup>. Enquanto que a ultrafiltração ocorreu em membrana tubular, com tamanho de poro de poro de 3 kDa, modelo UFP-3-E-

3MA, ambas fornecidas pela GE. Após a etapa de ultrafiltração, uma amostra foi coletada para verificar a composição de aminoácidos presentes no caldo, onde se verificou a presença em baixas concentrações de ornitina, lisina e asparagina (Figura 4.1).

Figura 4.1 –Aminograma do caldo de fermentação de cefamicina C.



1- ácido aspártico, 2- ácido glutâmico, 3- asparagina, 4- serina, 5- glicina, 6- histidina, 7- arginina, 8- treonina, 9- alanina, 10- prolina, 11- tirosina, 12- valina, 13- metionina, 14- cisteína, 15- isoleucina, 16- leucina, 17- fenilalanina, 18- ornitina e 19- lisina

#### 4.2.2 Determinação da concentração de cefamicina C

A cef C foi quantificada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), utilizando uma coluna Sinergy MAX RP 12 da PHENOMENEX como fase estacionária, e solução de ácido acético 0,01M como fase móvel, a uma vazão de 2 mL.min<sup>-1</sup>. A temperatura de separação foi de 28 °C e os picos foram detectados no comprimento de onda de 254 nm (BATISTA NETO et al., 2012).

#### 4.2.3 Determinação da concentração de aminoácidos

Os aminoácidos lisina, asparagina e ornitina foram quantificados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), baseado no método proposto por Henrikson (1984) utilizando-se uma coluna PICO-TAG, marca WATERS.

#### 4.2.4 Determinação das linhas de amarração e razão de volume de fase

As linhas de amarração (*tie-line*) do sistema composto por PEG e fosfato foram determinadas de acordo com o método descrito por Albertsson (1986) e calculadas a partir da Equação 4.1:

$$TLL = \sqrt{(P_t - P_f)^2 - (F_t - F_f)^2} \quad (4.1)$$

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

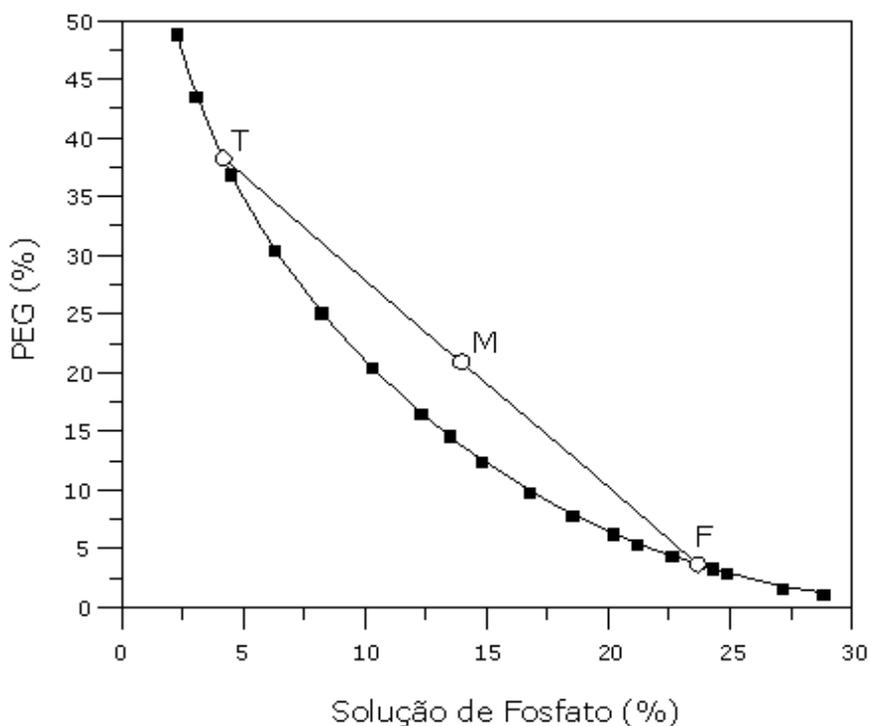
A razão de volume de fase ou razão entre as *tie-lines* ( $rTLL$ ) é determinada por meio de uma *tie-line* de composição inicial formada pelo ponto M, e composição final de cada fase, após atingir o equilíbrio, pelo ponto T para a fase de topo e ponto F para a fase de fundo, conforme pode ser observado na Figura 4.2. As razões de volume das fases foram calculadas conforme a Equação 4.2 (Albertsson, 1986).

$$rTLL = \frac{V_T \rho_T}{V_F \rho_F} = \frac{\overline{MF}}{\overline{MT}} \quad (4.2)$$

$$rTLL = \frac{V_T}{V_F} = \frac{\rho_F}{\rho_T} \frac{\overline{MF}}{\overline{MT}}$$

onde  $V$  e  $\rho$  são volume e densidade das fases, respectivamente. As densidades das fases com o polímero não são muito diferentes da fase da água (normalmente na razão entre 1,00 - 1,1) então a razão dos volumes entre as duas fases pode ser obtida, por consequência, entre as distâncias de MF e MT na *tie-line*. Sendo  $\overline{MF}$  e  $\overline{MT}$ , segmentos de reta que ligam o ponto M ao ponto de composição das fases de fundo e de topo.

Figura 4.2 – Exemplo de um diagrama de fases e linha de amarração.



#### 4.2.5 Determinação do Coeficiente de Partição ( $k_p$ ), Fator de Purificação (FP), Eficiência de Separação (ES) e Fator de concentração (FC).

O coeficiente de partição ( $k_p$ ) foi definido como a distribuição seletiva das substâncias entre as fases no equilíbrio termodinâmico da mistura sendo portanto a razão entre  $C_t$  e  $C_f$ , que corresponde à concentração das substâncias de interesse nas fases de topo e fundo, respectivamente. A Equação (4.3), representa esta definição.

$$k_p = \frac{C_t}{C_f} \quad (4.3)$$

A eficiência de separação do sistema foi definida de acordo com a Equação (4.4), onde  $k_{p_{cefC}}$  e  $k_{p_{cont}}$  são os coeficientes de partição da substância de interesse e contaminantes, respectivamente.

$$ES = \frac{k_{p_{cefC}}}{k_{p_{cont}}} \quad (4.4)$$

O fator de purificação do sistema foi definido de acordo com a Equação (4.5), onde  $C_0$  e  $C_{T0}$  correspondem às concentrações iniciais da substância de interesse e contaminantes, respectivamente, e  $C_t$  e  $C_T$  são as concentrações destes produtos na fase de topo.

$$PF = \frac{C_t \cdot C_{T0}}{C_0 \cdot C_T} \quad (4.5)$$

O fator de concentração foi determinado de acordo com a Equação (4.6), onde  $C_t$  é a concentração da cef C na fase de topo,  $C_0$  é a inicial cef C no sistema.

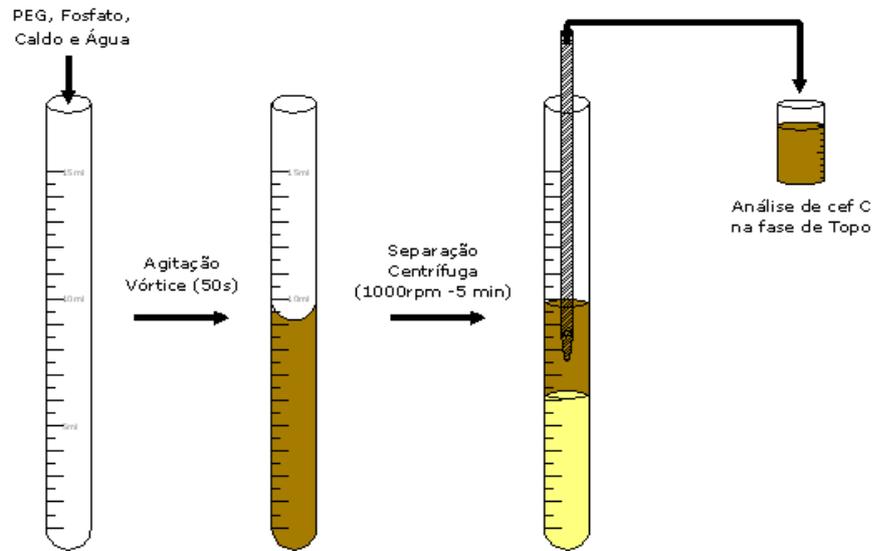
$$FC = \frac{C_t}{C_0} \quad (4.6)$$

### 4.3 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

Os sistemas de extração em duas fases aquosas foram realizados em tubos Falcons de 15 mL e massa final de 10 g. Calculou-se a massa necessária de cada composto (PEG e fosfato) e do caldo, para os sistemas estudados. Os aminoácidos (ornitina, lisina e asparagina) foram adicionados ao caldo contendo cef C, a fim de verificar a influência da concentração destes aminoácidos na extração da cef C, além de facilitar a análise quantitativa, visto que as concentrações dos aminoácidos no caldo estão abaixo do limite de quantificação da metodologia de análise utilizada. Foram testadas duas diferentes concentrações iniciais de aminoácidos, 20 mM e 166 mM. Os sistemas foram agitados em vórtice por 50 segundos e, em seguida, centrifugados por 5 minutos a 1000 rpm, para que atingissem o equilíbrio.

Nestes experimentos foram avaliados os seguintes parâmetros de processo: massa molecular de PEG (400, 600, 1000 e 4000), solução de fosfato, pH (6, 7 e 8), tamanho de *tie-line* (TLL = 37 e 43) e razão de volume de fases ( $rTLL = 0,75, 1,00$  e  $1,25$ ). Estas faixas foram pré-definidas, com base nos trabalhos de Silva et al. (2008) e Shang et al. (2004), nos quais foram realizados experimentos de extração de ácido clavulânico e extração de aminoácidos, respectivamente, por meio de S DFA. Todos os experimentos foram realizados em triplicata. Na Figura 4.3 é representado o esquema do aparato experimental utilizado na extração.

Figura 4.3- Esquema do aparato experimental utilizado na extração por SDEA.



#### 4.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nas Figura 4.4 a Figura 4. são apresentadas as curvas binodais de PEG e fosfato (ALBERTSSON, 1986), juntamente com as *tie-lines* de tamanhos 37 e 43, sugeridas por Silva et al. (2008), traçadas paralelamente, conforme proposto por Shang et al. (2004). Estes experimentos foram realizados com PEGs com diferentes massas moleculares (PEG de 400, 600, 1000 e 4000).

Figura 4.4 - Curva binodal para o sistema composto de polietileno glicol e fosfato para o PEG 400.

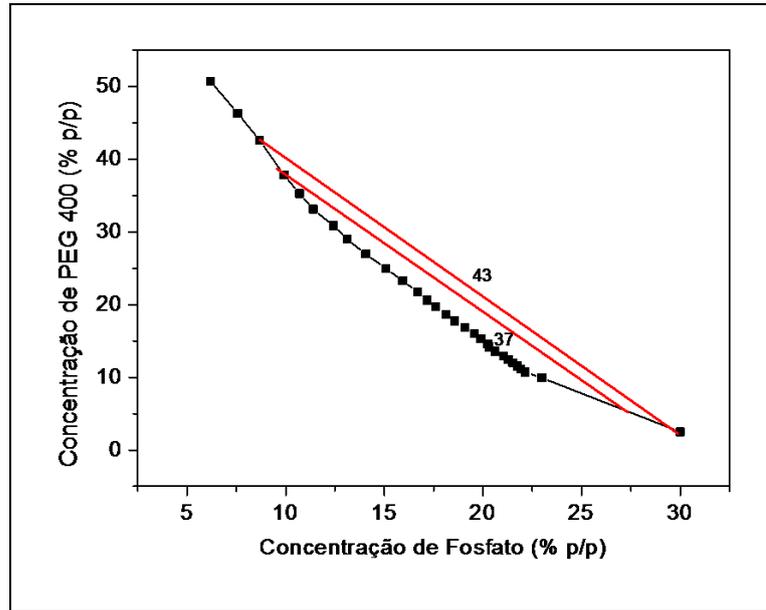


Figura 4.5 - Curva binodal para o sistema composto de polietileno glicol e fosfato com PEG 600.

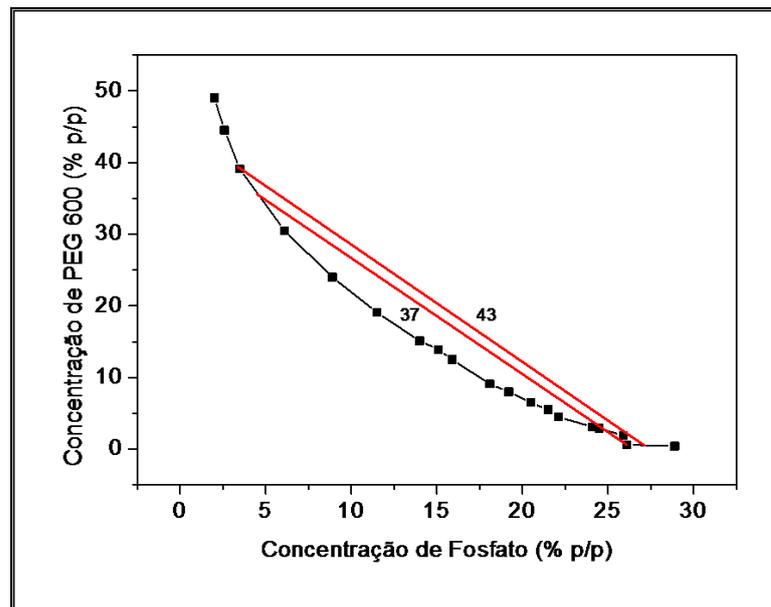


Figura 4.6 - Curva binodal para o sistema composto de polietileno glicol e fosfato com PEG 1000.

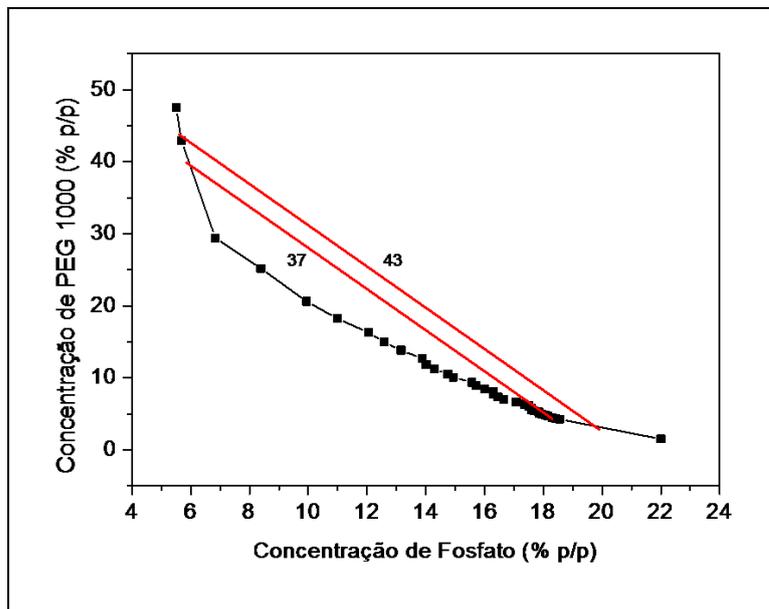
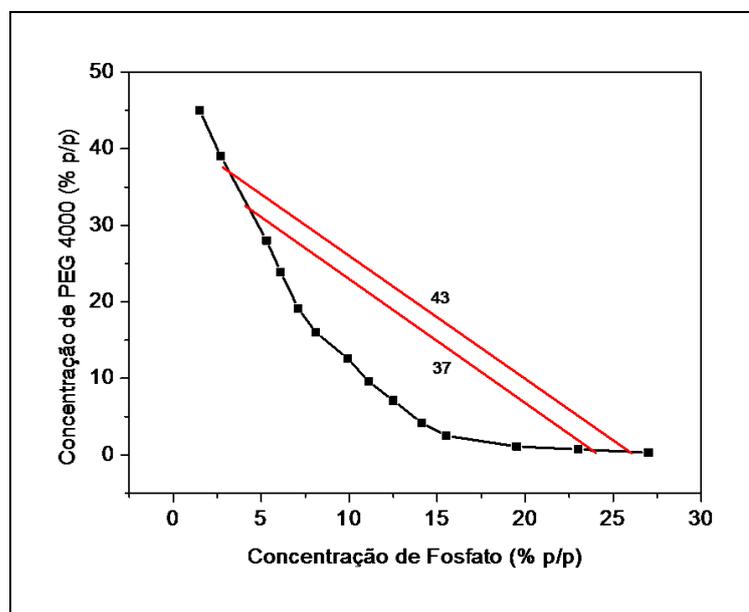


Figura 4.7 - Curva binodal para o sistema composto de polietileno glicol e fosfato com PEG 4000.



As composições dos sistemas de PEG e fosfato em função da razão de volume entre as fases topo e fundo, para as *tie-lines* de 37 e 47 são demonstrados na Tabela 4.1.

**Tabela 4.1 – Composições dos sistemas de PEG e fosfato**

PEG 400 – K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> – KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>			
PEG (% p/p)	Sal (% p/p)	rTLL	TLL
13,82	22,80	0,75	37
22,06	18,43	1,00	
30,30	14,05	1,25	
12,63	24,04	0,75	43
22,25	19,01	1,00	
31,87	13,97	1,25	
PEG 600 – K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> – KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>			
PEG (% p/p)	Sal (% p/p)	rTLL	TLL
11,39	19,52	0,75	37
19,39	14,55	1,00	
27,39	9,58	1,25	
9,93	21,05	0,75	43
19,22	15,34	1,00	
28,51	9,62	1,25	
PEG 1000 – K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> – KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>			
PEG (% p/p)	Sal (% p/p)	rTLL	TLL
13,65	15,24	0,75	37
22,43	12,15	1,00	
31,21	9,05	1,25	
13,42	16,58	0,75	43
23,63	12,94	1,00	
33,84	9,29	1,25	
PEG 4000 – K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> – KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>			
PEG (% p/p)	Sal (% p/p)	rTLL	TLL
8,64	19,29	0,75	37
16,61	14,28	1,00	
24,58	9,27	1,25	
9,52	20,40	0,75	43
18,71	14,68	1,00	
27,90	8,96	1,25	

Os resultados obtidos para o coeficiente de partição da cef C, em função da razão de volume de fases (rTLL), nos diferentes sistemas estudados, são apresentados nas Figura 4. a Figura 4..

Figura 4.8 – Coeficiente de partição da cefamicina C, em função da rTLL (PEG 400 e TLL 37).

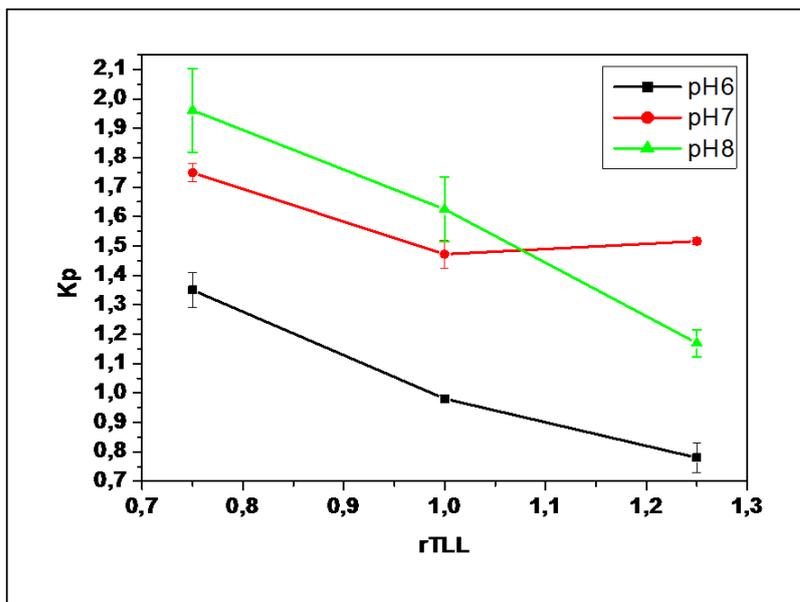
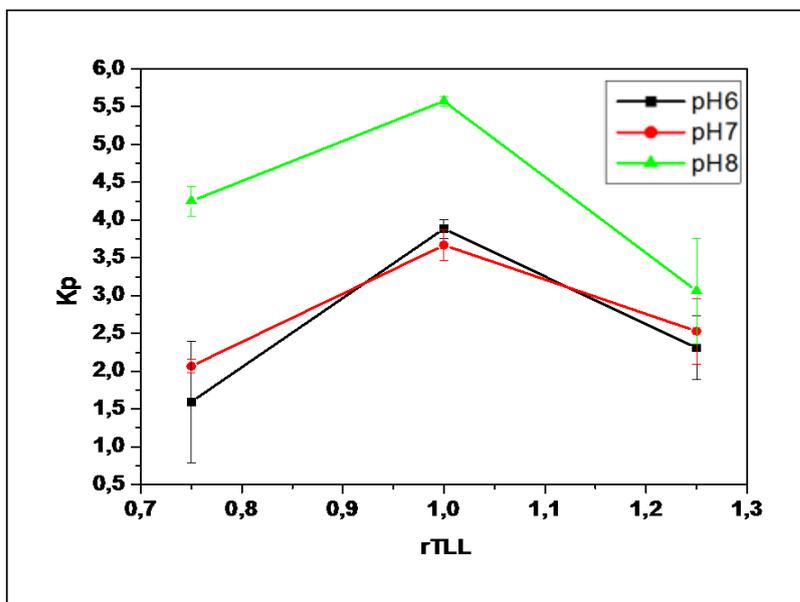


Figura 4.9 - Coeficiente de partição da cefamicina C, em função da rTLL (PEG 400 e TLL 43).



A partir da análise da Figura 4.8, observou-se que os maiores valores de  $k_p$  da cef C, com PEG 400 e TLL 37, foram obtidos na rTLL 0,75, onde o volume de fundo é maior. Enquanto que no TLL 43 (Figura 4.9), os maiores valores de  $k_p$  foram obtidos na rTLL 1,

onde os volumes de topo e fundo são iguais. Em relação à influência do pH, nas duas TLLs (37 e 43) os maiores  $k_p$  foram obtidos no pH 8.

Figura 4.10 - Coeficiente de partição da cefamicina C, em função da rTLL (PEG 600 e TLL 37).

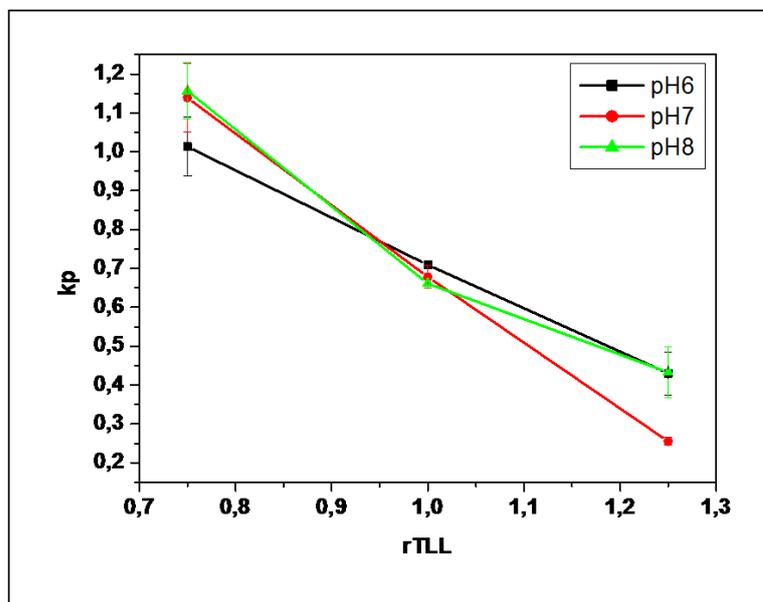
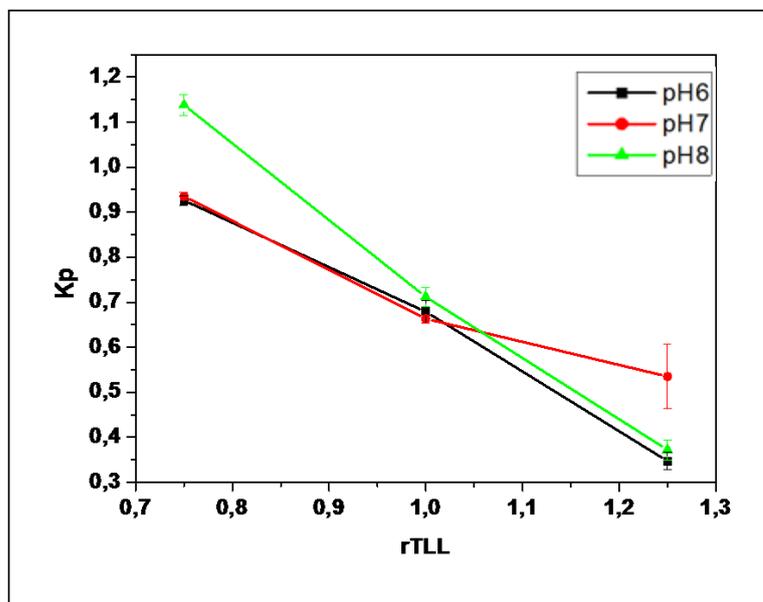


Figura 4.11 - Coeficiente de partição da cefamicina C, em função da rTLL (PEG 600 e TLL 43).



Os resultados obtidos com PEG 600 (Figura 4.10 e Figura 4.11) mostraram um comportamento semelhante para as duas TLL avaliadas (37 e 43). Verificou-se um decréscimo dos valores de  $k_p$ , em função do aumento da razão de volume de fases (rTLL). Os maiores valores de  $k_p$  foram obtidos em pH 8 e rTLL 0,75, em ambos os tamanhos de *tie-*

lines, sendo que em pH 7 e TLL 37, o valor de  $k_p$  mostrou-se muito próximo ao obtido em pH 8.

Figura 4.12 - Coeficiente de partição da cefamicina C, em função da rTLL (PEG1000 e TLL 37).

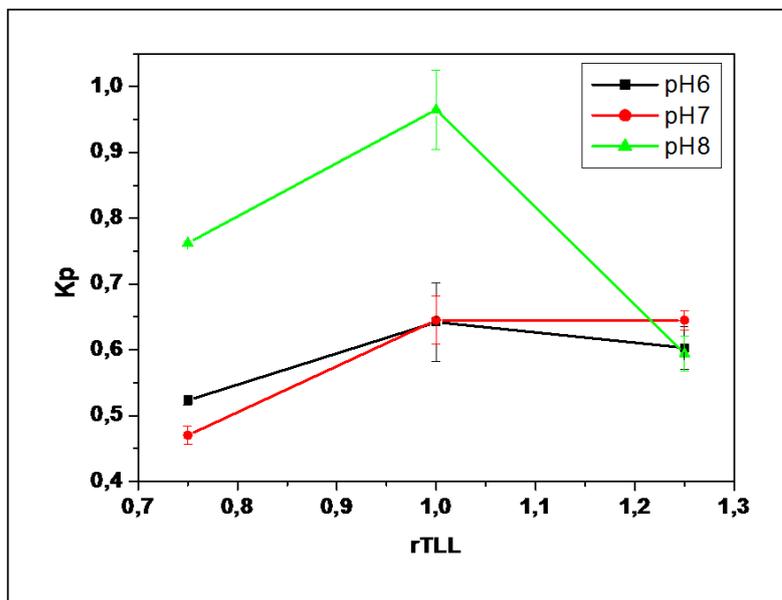
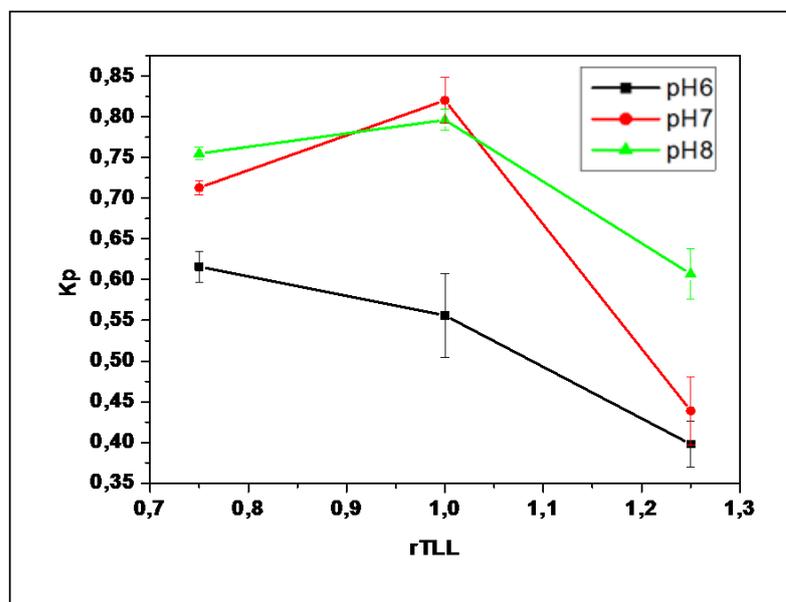


Figura 4.13 - Coeficiente de partição da cefamicina C, em função da rTLL (PEG 1000 e TLL 43).



O aumento da massa molecular de PEG para 1000, influenciou negativamente no coeficiente de partição da cef C, conforme pode ser observado nas Figuras 4.12 e Figura 4.13. Os valores de  $k_p$  inferiores a 1,0 indicam que a cef C deslocou-se para a fase de fundo, o que não era desejado neste estudo, devido à alta concentração de sal de fosfato nesta fase. Como a

etapa seguinte deste trabalho está proposto a separação da cefamicina C do sistema de duas fases PEG/fosfato por adsorção em resina aniônica, os ânions do sal em alta concentração devem interferir na adsorção da cefamicina C na resina.

Valores de  $k_p$  inferiores a 1,0 também foram observados nas Figura 4.10 e Figura 4.11, exceto na rTLL 0,75, onde a maior parte destes valores foram ligeiramente superiores a 1,0.

Figura 4.14 - Coeficiente de partição da cefamicina C, em função da rTLL (PEG4000 e TLL 37).

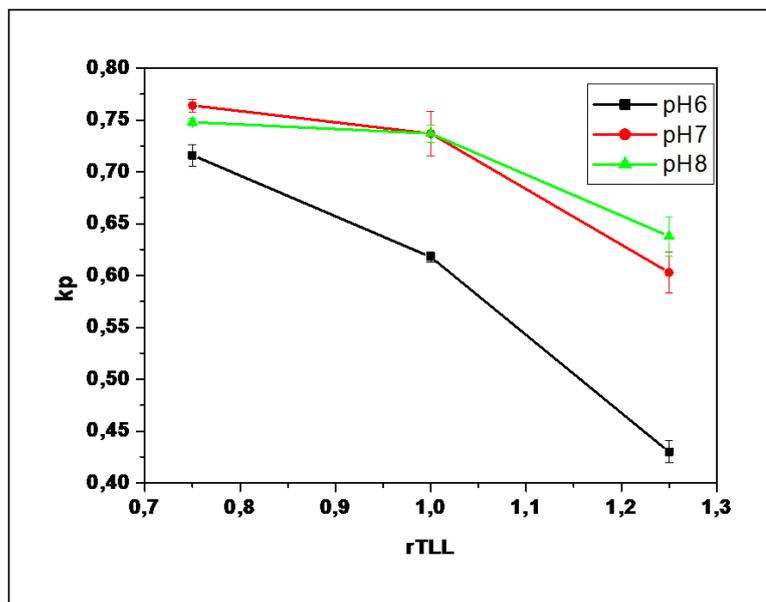
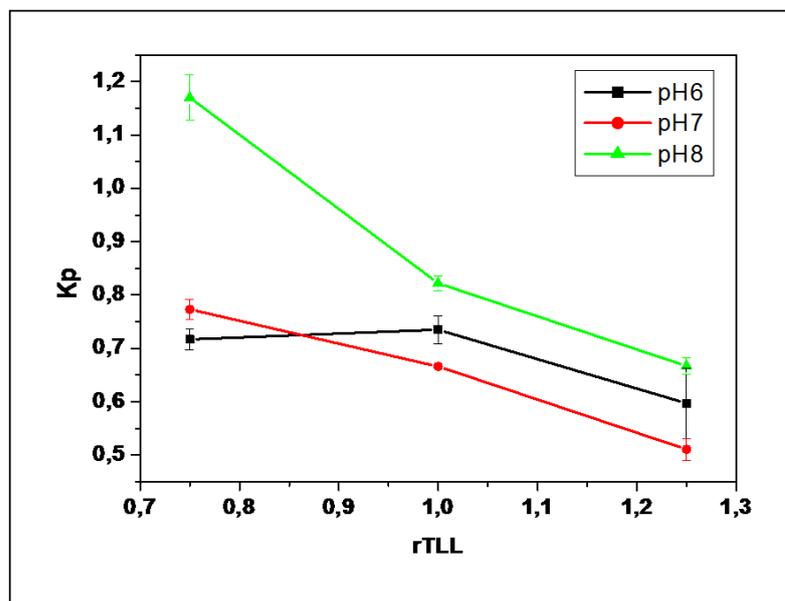


Figura 4.15 - Coeficiente de partição da cefamicina C, em função da rTLL (PEG 4000 e TLL 43).



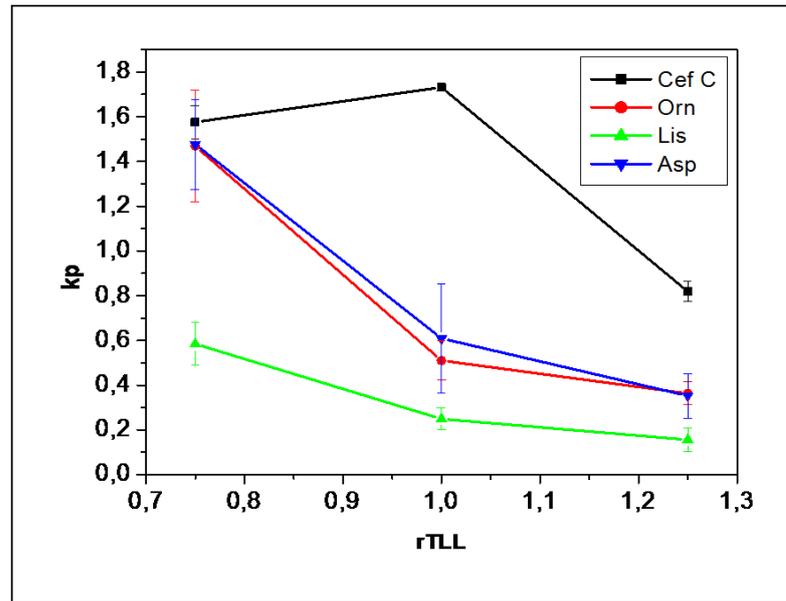
A partir da análise das Figura 4. e Figura 4., com PEG 4000, constatou-se novamente que o aumento da massa molecular de PEG promoveu a diminuição do valor do coeficiente de partição da cef C. Verificou-se que todos os valores foram inferiores a 1,0, exceto o valor obtido no seguinte sistema: TLL 43, rTLL 0,75 e pH 8.

Após a avaliação dos 72 sistemas testados, concluiu-se que o melhor sistema para promover a extração da cef C, do caldo fermentado foi: PEG 400, pH 8,0, TLL 43 e rTLL 1,00, onde foi obtido o coeficiente de partição igual a 5,57.

Na etapa seguinte do trabalho, utilizando-se o melhor sistema determinado anteriormente, foram avaliados o fator de purificação (FP), eficiência de separação (ES) e fator de concentração (FC) da cef C, em relação aos aminoácidos (ornitina, lisina e asparagina) presentes no caldo. Os experimentos foram realizados com a adição de aminoácidos no caldo, nas concentrações de 20 mM e 166 mM, a fim de avaliar a influência da concentração destes no processo de extração de cef C, e permitir a quantificação dos mesmos pelo método de análise proposto, uma vez que em baixas concentrações não seria possível quantificá-los e, conseqüentemente, calcular FP, ES e FC.

Apesar de determinado anteriormente a rTLL 1,0 como sendo a melhor, foram realizados experimentos nas outras duas rTLL (0,75 e 1,25), a fim de possibilitar uma melhor visualização dos resultados. Na Figura 4., na rTLL 1,0 e concentração de aminoácidos de 20 mM, verificou-se com nitidez a separação da cef C, em relação aos aminoácidos presentes no caldo. A cef C deslocou-se para a fase de topo, alcançando o valor de  $k_p$  de 1,73, enquanto que os aminoácidos deslocaram-se para a fase de fundo, com valores de  $k_p$  entre 0,25 e 0,61.

Figura 4.16 - Coeficiente de partição da cefamicina C e aminoácidos em função da rTLL em PEG 400, pH 8,0 e naTLL 43 ( $C_0$  aminoácidos - 20 mM).



Orn = Ornitina, Lis = lisina e Asp = asparagina

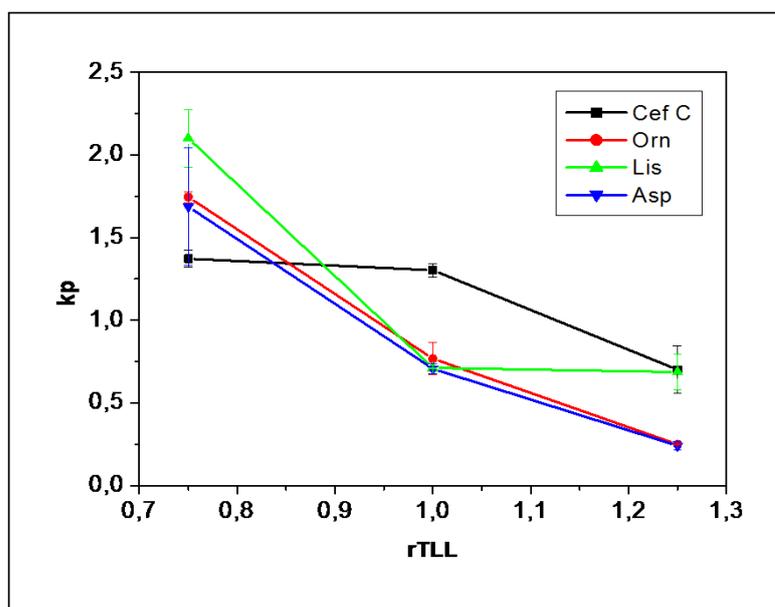
Conforme relato de Shang et al. (2004) a fase salina em S DFA pode alterar a carga eletrostática dos sistemas. Desta forma, os aminoácidos com cadeias laterais carregados positivamente preferem a fase rica em sal, já os carregados negativamente preferem a fase rica em polímero. Na Figura 4. é possível observar este comportamento, onde a lisina, cuja cadeia lateral é carregada positivamente, deslocou-se para a fase de fundo. Enquanto que a cef C, que apresenta carga negativa em pH 8,00, deslocou para a fase de topo devido à repulsão causada frente aos ânions do sal.

Os resultados experimentais mostram que as estruturas dos grupos laterais dos aminoácidos têm uma influência significativa no coeficiente de partição em S DFA. Os aminoácidos lisina e asparagina possuem valores de hidropatia de -3,9 e -3,5, respectivamente. Estes valores são uma combinação das escalas de hidrofobicidade e hidrofiliabilidade dos grupos laterais dos aminoácidos (LEHNINGER, 1993). Os valores negativos indicam que os aminoácidos são mais hidrofílicos, confirmando a tendência destes a se deslocarem para a fase salina. As polaridades dos grupos laterais dos aminoácidos variam amplamente, desde não polar e hidrofóbico (insolúvel em água), para altamente polar e hidrofílico (solúvel em água). A lisina é um aminoácido que possui grupos laterais polares e carregados positivamente, por isso é altamente hidrofílico.

Os mesmos experimentos foram realizados com uma concentração inicial maior de aminoácidos no caldo (166 mM), a fim de avaliar a sua influência no processo de extração da

cef C. A partir da análise da Figura 4., observou-se que o aumento da concentração inicial dos aminoácidos influenciou negativamente o processo. Verificou-se que nas rTLL 0,75 e 1,25 não ocorreu a separação, os aminoácidos e a cef C permaneceram juntos nas fases de topo e fundo. Na rTLL 1,0 a separação ocorreu e os valores obtidos de  $k_p$  foram: 1,30 para a cef C e, 0,71 a 0,77 para os aminoácidos.

**Figura 4.17 - Coeficiente de partição da cefamicina C e aminoácidos em função da rTLL em PEG 400, pH 8,0 e naTLL 43 ( $C_0$  aminoácidos - 166 mM).**



Orn = Ornitina, Lis = lisina e Asp = asparagina

De acordo com Franco et al. (2005) o SDFA é eficiente para concentrações muito baixas de proteínas ou de outras biomoléculas (inferiores a 1 g/L), de modo que a composição das fases praticamente não se modifica. Porém, para altas concentrações, pode haver influência na formação das fases, ocorrendo a redistribuição dos componentes do sistema, modificando o diagrama de fases e, conseqüentemente, o valor do coeficiente de partição. No presente trabalho tal comportamento foi verificado, onde o coeficiente de partição obtido para a cef C foi 5,57, no caldo fermentado com baixa concentração de aminoácidos. Enquanto, que nos experimentos realizados com adição de aminoácidos (20 mM e 166 mM) os valores de  $k_p$  obtidos foram 1,73 e 1,30, respectivamente, indicando a alteração do diagrama de fases e, conseqüentemente, a influência dos valores de  $k_p$ . Na Tabela 4.2 são apresentados os valores de  $k_p$  para a cef C, obtidos nas diferentes condições de concentração de aminoácidos.

**Tabela 4.2 - Coeficiente de partição da cefamicina C no sistema (PEG 400, pH 8 e TLL 43), em função da rTLL, no caldo sem adição de aminoácidos e com adição de 20 mM e 166 mM dos aminoácidos ornitina, lisina e asparagina.**

rTLL	SEM ADIÇÃO	20 mM	166 mM
0,75	4,25	1,58	1,72
1	5,57	1,73	1,30
1,25	3,06	0,82	0,70

Na Tabela 4. são apresentados os valores de eficiência de separação (ES), fator de purificação (FP) e fator de concentração (FC) da cef C, para as concentrações iniciais de aminoácidos de 20 mM e 166 mM, respectivamente. Os maiores valores de eficiência de separação (ES) e fator de purificação (FP) da cef C foram obtidos na rTLL igual a 1,0 e concentração inicial de aminoácidos de 20 mM, onde também verificou-se o maior coeficiente de partição (1,73), conforme apresentado na Figura 4..

**Tabela 4.3 - Eficiência de separação (ES), fator de purificação (FP) e fator de concentração (FC) da cefamicina C em função da rTLL (C<sub>0</sub> aminoácidos - 20 mM e 166 mM).**

Concentração Inicial de Aminoácidos	rTLL	Ornitina		Lisina		Asparagina		FC
		ES	FP	ES	FP	ES	FP	
20 mM	0,75	1,1	7,5	2,7	7,6	1,1	3,7	0,16
	1	3,4	14,3	6,9	11,4	2,8	4,8	0,15
	1,25	2,3	11,0	5,3	9,8	2,3	3,9	0,12
166 mM	0,75	0,8	13,6	0,6	6,8	0,8	2,3	0,15
	1	1,7	19,8	1,8	10,1	1,8	3,5	0,14
	1,25	2,8	22,3	1,0	10,7	2,9	4,3	0,11

No trabalho realizado por Silva et al. (2012) foram avaliados os aminoácidos lisina, tirosina, prolina e histidina, e obtidos os fatores de purificação, em relação ao ácido clavulânico, de 3, 10, 10 e 20, respectivamente. Comparando os resultados de fator de purificação dos aminoácidos avaliados em relação à cef C, apresentados na Tabela 4., com os resultados obtidos por Silva et al. (2012), observou-se valores da mesma ordem de grandeza.

## 4.5 CONCLUSÕES

Os experimentos realizados na primeira etapa deste trabalho permitiram concluir que o coeficiente de partição da cef C aumentou com a diminuição da massa molecular de PEG. Em relação ao pH, verificou-se que o  $k_p$  apresentou maiores valores em pH 8, pois a cef C apresenta maior hidrofobicidade nestas condições. Dentre os 72 sistemas testados, o melhor sistema para extração da cef C do caldo fermentado foi: PEG 400, pH 8,0, TLL 43 e rTLL 1,00, onde o coeficiente de partição obtido foi igual a 5,57.

No melhor sistema definido concluiu-se que a separação da cefamicina C do caldo, é mais efetiva em concentrações iniciais menores de aminoácidos (20 mM). Com esta concentração, o maior coeficiente de partição ( $k_p$ ) foi 1,73 e o fator de concentração (FC) 0,15, na rTLL igual 1,0. Neste sistema os fatores de purificação FP da cef C em relação aos aminoácidos foram: 14,34 (ornitina), 11,39 (lisina) e 4,83 (asparagina) e os seus coeficientes de partição foram menores que 1, confirmando que os aminoácidos estavam na fase de fundo. Estes resultados corroboram com a viabilidade da aplicação do SDFA, composto com PEG/fosfato, para a purificação da cef C.

## 4.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERTSSON, P. A. Partition of cell particles and macromolecules. 3<sup>a</sup> ed. New York, John Wiley & Sons, p.346, 1986.

BAPTISTA NETO, A.; OLIVEIRA, J. H H L ; BELLÃO, C.; BADINO , A. C. ; BARBOZA, M ; BELLÃO, 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, p.1-5, 2012.

BELLÃO, C.; BAPTISTA NETO, A.; BADINO JR, A. C. Avaliação de meios de Cultura para a Produção de Cefamicina C por *Streptomyces clavuligerus* em Batelada. *anais do XVI Simpósio Nacional de Bioprocessos*. Curitiba-PR, 2007.

BORA, M.M.; BORTHAKUR, S.; RAO, P.C.; DUTTA, N.N. Aqueous two-phase partitioning of cephalosporin antibiotic: effect os solute chemical nature. *Separation and Purification Technology*. v.45, p. 153-156, 2005.

FRANCO, T. T.; KILIKIAN, B. V.; COIMBRA, J. S. R.; MEIRELLES, A. J. A. Extração líquido-líquido em sistemas de duas fases aquosas. In: Pessoa Jr. A.; Kilikian, B. V. Purificação de produtos biotecnológicos, 1ª ed. Barueri-SP, Manole, p. 114-165, 2005.

HENRIKSON R.L.; MEREDITH S.C. Amino acid analysis by reverse phase highperformance liquid chromatography precolumn derivatization with phenylthiocyanate analytical. *Biochemistry* v.13, p. 65-72, 1984.

LEHNINGER, A. L., 1917-. *Principles of biochemistry: with an extended discussion of oxygen-binding proteins*. 2 ed. New York: Worth, 1013 p., 1993.

MISTRY, S.L.; KAUL, A.; MERCHUK, J.C. ASENJO, J.A. Mathematical modelling and computer simulation of aqueous two-phase continuous protein extraction. *Journal of Chromatography A*, v.741, p.151-163, 1996.

OMSTEAD D.R.; HUNT G.H.; BUCKLAND B.C. Commercial production of cephamycin antibiotics. In: Moo-Young, M. *Comprehensive biotechnology*, vol. 3 (The practice of biotechnology: current commodity products), cap. 9, Pergamon Press Inc., USA p. 187, 1985.

SARMENTO, M. J.; PIRES, M. J.; CABRAL, J. M. S.; AIRES-BARROS, M. R. Liquid-liquid extraction of a recombinant protein, cytochrome b5, with aqueous two-phase systems of polyethylene glycol and potassium phosphate salts. *Journal of Chromatography A*, v. 668, p. 117-120, 1994.

SHANG, Q.K.; LI, W.; JIA, Q.; LI D.Q. Partitioning behavior of amino acids in aqueous two-phase systems containing polyethylene glycol and phosphate buffer. *Fluid Phase Equilibria*. v. 219, p. 195–203, 2004.

SILVA, C. S.; BAVAROTI, E.; RODRIGUES, M. I.; HOKKA, C.O.; BARBOZA, M. Evaluation of the effects of the parameters involved in the purification of clavulanic acid from fermentation broth by aqueous two-phase systems. *Bioprocess and Biosyst. Eng.* 2008.

SILVA, C. S.; CUEL, M. F.; BARRETO, V. O.; KWONG, W. H.; HOKKA, C. O.; BARBOZA, M. Separation of clavulanic acid from fermented broth of amino acids by aqueous two-phase system and ion-exchange adsorption. *New Biotechnology*. v.29, nº 3, p. 428-431, 2012.

SILVA, C. S.; RODRIGUES, G.Y.; HOKKA, C.O.; BARBOZA, M. Study of Fouling Index in Tangential Filtration Applied for Separation of Clavulanic Acid from Fermentation Broths. In: Antonio Mendez-Vilas. (Org.). *Current Research Topics in Applied Microbiology and*

Microbial Biotechnology. World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd., Sevilha, p. 765-777, 2009.

STAPLEY E.O.; JACKSON M.; HERNANDEZ S.; ZIMMERMAN S.B.; CURRIE S.A.; MOCHALES S.; MATA J.M.; WOODRUFF H.B.; HENDLIN D., Cephamycins, a new family of  $\beta$ -lactam antibiotics. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. v.2, p. 122-131, 1972.

# **CAPÍTULO 5**

---

**Recuperação da cefamicina C absorvida  
na fase PEG utilizando cromatografia de  
troca iônica**

## **Recuperação da cefamicina C absorvida na fase PEG utilizando cromatografia de troca iônica**

**RESUMO** - O principal objetivo deste trabalho foi desenvolver uma técnica de extração e purificação da cefamicina C (cef C) do caldo fermentado, através das seguintes etapas: extração líquido-líquido utilizando um sistema de duas fases aquosas (SDFA), seguida da recuperação da cef C da fase de topo, por adsorção com resina de troca iônica. As condições experimentais utilizadas no processo de extração por sistema de duas fases aquosas (SDFA) composto por uma mistura de PEG e fosfato, determinada como sendo a primeira etapa do processo, foram: PEG 400, pH 8,0, tamanho de *tie-line* (TLL 43) e razão de volume entre as fases (rTLL 1,00), conforme determinado no capítulo 4 deste trabalho. Na segunda etapa foram realizados experimentos de adsorção e dessorção da cef C, com utilização de três resinas aniônicas sendo (Amberlite IRA-400 Cl, Streamline QXL e Streamline DEAE-Agarose), a fim de definir qual material possui maior afinidade com a cefamicina C. Estes experimentos foram realizados sob temperaturas de 20, 25 e 30°C, em pH de 2,8 e 6,8. A resina Amberlite IRA-400 Cl, mostrou maior capacidade de adsorção, sendo escolhida para a continuidade do trabalho. Os melhores resultados foram obtidos no pH de 6,8 e na temperatura de 25 °C. Foram realizados experimentos em coluna de leito fixo, visando promover a recuperação da cef C presente na fase de topo. Com os resultados obtidos foi possível determinar a eficiência de separação (ES) e o fator de purificação (FP), que mostraram ser viável a aplicação do processo proposto para a separação e purificação da cef C.

Palavras-Chave: cefamicina C, troca iônica e extração líquido-líquido.

## **5.1 INTRODUÇÃO**

Dentro do grupo dos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, a cefamicina C destaca-se por apresentar maior estabilidade frente à ação das enzimas  $\beta$ -lactamases. (BAGALEY, BRONW e SCHOFIELD, 1997). A cefamicina C é utilizada como matéria-prima para a produção de antibióticos semi-sintéticos, como por exemplo, a cefoxitina e cefotetan, que são altamente ativos contra bactérias gram-negativas e gram-positivas.

O processo típico de purificação de antibióticos  $\beta$ -lactâmicos geralmente envolve as etapas de remoção de células, cromatografia de troca catiônica e aniônica, adsorção não específica, extração por solventes e cristalização. A sequência de realização destas etapas, bem como a combinação delas, depende das características físico-químicas do produto final (OMSTEAD, HUNT e BUCKLAND, 1985). Pessoa Jr. e Kilikian (2005) afirmam que o número de etapas de um processo de purificação pode ser otimizado, combinando finalidades diferentes em uma única etapa, por exemplo, clarificando, concentrando e pré-purificando, simultaneamente, por extração em sistema de duas fases aquosas (SDFA).

Para produtos que exigem elevado grau de pureza, como por exemplo, os produtos farmacêuticos, a extração em SDFA não é suficiente e, nesses casos, será sucedida por uma ou mais etapas de cromatografia. O SDFA é considerado uma etapa de purificação primária ou de baixa resolução (FRANCO et al., 2005). Na literatura são encontrados trabalhos de separação de antibióticos  $\beta$ -lactâmicos por sistemas de duas fases aquosas, como por exemplo, Hirata (2003), Yang et al. (1994), Videira e Aires-Barros (1994), Silva et al. (2008), Silva et al. (2012), dentre outros.

Em se tratando de produtos que exigem alto grau de pureza, a cromatografia, seja ela por troca iônica, afinidade ou exclusão molecular são normalmente empregadas como etapa complementar do processo de purificação.

Mayer et al. (1996) estudaram a adsorção do ácido clavulânico (AC) nas resinas de superfícies apolares, Amberlite (XAD-4 e XAD-2) e na resina de troca iônica, Amberlite IRA-400. Os resultados mostraram que existe uma fraca interação entre o AC e a superfície apolar das resinas XAD-4 e XAD-2, não sendo possível recuperar o AC por adsorção não específica. Os resultados obtidos com a resina de troca iônica, Amberlite IRA-400, em coluna de leito fixo foram: fator de concentração 2,0, fator de purificação 1,64 e rendimento 65%.

A recuperação do AC por cromatografia de troca iônica, com a resina Amberlite IRA-400, foram realizados por Barboza, Almeida e Hokka, (2002a). Observaram que a

redução do pH ocasionou um aumento na capacidade de adsorção e na afinidade de adsorção do AC. A troca iônica do AC em resina Amberlite IRA-400 é favorecida com a diminuição da temperatura, mostrando que a adsorção do AC na resina IRA-400 é exotérmica.

Silva et al. (2012) estudaram a separação do AC de aminoácidos adicionado no caldo por sistema de duas fases aquosas (SDFa) e a re-extração do AC da fase de topo (PEG) por adsorção de troca iônica. Para uma purificação parcial do AC dos aminoácidos (lisina, tirosina, prolina e histidina) presentes no caldo após a ultrafiltração utilizaram a técnica de extração por SDFa, composto por 17% (p/p) de PEG 600 e 15% (p/p) de fosfato de potássio. Em seguida, foi realizada a adsorção por troca iônica, para a recuperação do AC da fase de topo e sua purificação. As resinas de troca iônica testadas na segunda etapa do processo foram Amberlite IRA-400 e Streamline QXL. Os resultados obtidos com a resina Streamline QXL foram: fator de concentração (FC) 2,0 e purificação de 100%, em relação aos aminoácidos lisina, histidina, prolina e tirosina. Para a resina Amberlite IRA-400, os resultados obtidos foram: FC 1,9 e purificação de 100%, em relação aos aminoácidos lisina, tirosina e histidina, e fator de purificação (FP) 4,1, para prolina.

Na literatura encontram-se inúmeros trabalhos sobre os processos de extração, separação e purificação da cefalosporina C. Dentre eles, cita-se Bora et al. (2005); Lin e Chu (1995) e Yang et al. (1994), para o processo de extração por sistema de duas fase aquosas e, para os processos de adsorção, Chaubal et al. (1995), Lee et al. (1996) e Barboza et al. (2002c).

Enquanto que para a cefamicina C os processos de separação e purificação estão disponíveis na literatura em patentes e descritos de forma superficial, como por exemplo: Pines (1973), Kamogashira et al. (1982) e Schubert (1980). Recentemente, os seguintes trabalhos foram publicados acerca da análise, separação e purificação da cef C, Baptista Neto et al. (2012a e 2012b). Os autores realizaram o estudo da purificação da cef C produzida pelo micro-organismo *Streptomyces clavuligerus*, a partir do caldo fermentado e também propuseram uma metodologia de análise da cef C, por cromatografia líquida de alto desempenho (CLAE). Para o estudo da purificação da cef C, inicialmente o caldo foi microfiltrado e ultrafiltrado e, em seguida submetido à adsorção não-específica e cromatografia de troca iônica em coluna de leito fixo. A partir dos resultados obtidos, os autores concluíram que a adsorção da cef C em resina não-específica (XAD-1180) não ocorreu em solução neutra, requerendo um pH de 3,5 ou inferior. No entanto, foi possível remover pigmentos e outros contaminantes com a resina XAD-1180 a um pH de 6,8. Esta

etapa é necessária para evitar que estes pigmentos se liguem na resina de troca iônica (Streamline Q XL), de forma irreversível, resultando em sua perda.

Deste modo, fica evidente a importância do desenvolvimento de um processo de separação e purificação para a cef C, devido à sua importância no mercado farmacêutico. O presente trabalho trata da separação da cef C do caldo fermentado, através de processos de extração líquido-líquido, utilizando o SDFa composto por PEG e fosfato, seguido de adsorção por troca iônica como uma etapa de recuperação e purificação do antibiótico presente na fase de topo (PEG).

## 5.2 MATERIAL E MÉTODOS

### 5.2.1 Tratamento do caldo fermentado

Para a realização dos experimentos foram utilizados caldos oriundos de cultivos de *Streptomyces clavuligerus* DSM 41826 em biorreator, em meio contendo derivados de soja e lisina como fonte de nitrogênio e glicerol como fonte de carbono e energia (BELLÃO et al. 2007). O caldo inicialmente foi centrifugado e em seguida microfiltrado em membrana de 0,22 µm de tamanho de poro e ultrafiltrado em membrana com 3 kDa, utilizando módulos de filtração da GE com 3.600 cm<sup>2</sup> e 110 cm<sup>2</sup> de área de membrana, respectivamente. Estas membranas operam de forma a obter escoamento tangencial sobre sua superfície, o concentrado é permanentemente reciclado, e o permeado coletado e armazenado para estudos posteriores (SILVA et al. 2009).

### 5.2.2 Resina de troca iônica

Três resinas aniônicas foram utilizadas para os experimentos de adsorção e dessorção por troca iônica:

- a) Resina Streamline Q XL (GE)
- b) Resina Streamline DEAE - Agarose (GE)
- c) Resina Amberlite IRA-400 Cl (Rohm & Haas)

### 5.2.3 Determinação da concentração de cefamicina C

A concentração de cef C foi determinada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), de acordo com a metodologia desenvolvida no laboratório do DEQ/UFSCar, na qual é utilizada a coluna Sinergy MAX RP 12 (Phenomenex) como fase estacionária, e solução de ácido acético 0,01 M como fase móvel, a uma vazão de 2 mL.min<sup>-1</sup>. A temperatura da separação foi de 28 °C e os picos foram detectados no comprimento de onda de 254 nm. A curva de calibração foi obtida através da injeção de vários valores de concentração obtidos por bioensaio de cefalosporina C utilizando *Escherichia coli* ESS (BAPTISTA-NETO et al., 2012b).

### 5.2.4 Determinação dos contaminantes

Em um espectrofotômetro UV/VIS (Pharmacia Biotech) foi realizada uma varredura da absorbância das amostras, entre os comprimentos de onda de 300 a 450 nm, de modo a identificar apenas os contaminantes presentes no caldo. Essa faixa de comprimento de onda foi escolhida, pois a cef C absorve luz somente em comprimentos de onda menores que 300 nm. Os contaminantes foram quantificados através da área obtida, após a integração da curva absorbância *versus* comprimento de onda (unidades de absorbância \* nm).

### 5.2.5 Determinação da concentração de PEG

A determinação da concentração de PEG foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), utilizando-se uma coluna SHODEX KS-802 (Lompak, divisão Millipore) como fase estacionária, e água deionizada como fase móvel. A análise foi realizada sob temperatura de 80 °C e vazão de 1 mL.min<sup>-1</sup>. Os picos foram detectados no medidor de índice de refração W410 (Waters).

### 5.2.6 Determinação da concentração de fósforo

Para determinação do fósforo nas amostras foi utilizado o método azul de molibdato. Inicialmente, fez-se uma curva de calibração de acordo com a massa total de fósforo no sistema. Em balões volumétricos de 100 mL, adicionou-se 0,5; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 mL de

solução de fósforo padrão ( $100 \text{ mg.L}^{-1}$ ), completando o volume com água deionizada (o “branco” foi feito apenas com água destilada). Então, uma alíquota de 1 mL de cada solução com concentração diferente, foi adicionada em cinco Erlenmeyer de 100 mL. Nestes Erlenmeyers foram adicionados, em cada um, 2 mL de solução 0,15% (p/p) de sulfato de hidrazina, 5 mL de solução de molibdato de amônio e 50 mL de água deionizada. Em seguida, os Erlenmeyers foram fechados com rolhas furadas e levados para um banho termostatizado, à temperatura de  $90 \text{ }^\circ\text{C}$ , durante 10 min. Após este período, os Erlenmeyers foram submetidos a um banho de gelo para resfriamento. Logo após o resfriamento, as soluções dos Erlenmeyers foram transferidas para balões de 100 mL, tendo o seu volume completado com água deionizada. A leitura de absorvância foi realizada a 830 nm, em espectrofotômetro UV/VIS (Pharmacia Biotech) (VOGEL, 1989).

### **5.2.7 Determinação da concentração dos aminoácidos**

Os aminoácidos lisina, asparagina e ornitina foram quantificados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), baseado no método proposto por Henrikson (1984) utilizando-se uma coluna PICO-TAG, marca WATERS.

## **5.3 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL**

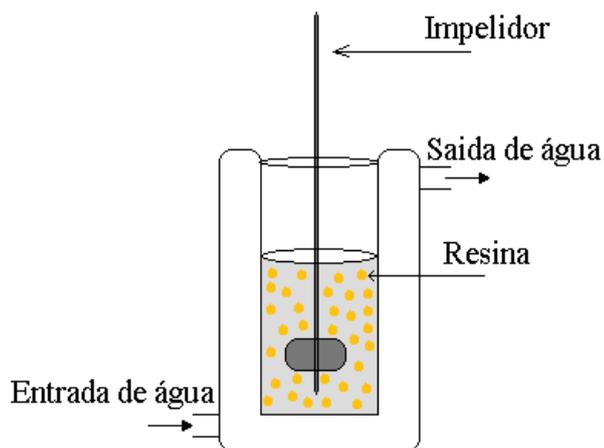
### **5.3.1 Cinéticas de adsorção e dessorção**

Os estudos cinéticos de adsorção e dessorção em reator descontínuo foram realizados com a resina Amberlite IRA 400, a fim de determinar as melhores condições de pH e temperatura para o processo. Os experimentos foram realizados em um reator encamisado de 150 mL, com volume de trabalho de 100 mL, provido de agitação mecânica e controle de temperatura por meio de banho termostatizado, conforme ilustrado na Figura 5.1. O volume de trabalho utilizado correspondeu à soma do volume de caldo, da solução tampão citrato (pH 2,8 e 6,8) e à quantidade de resina (7 g) em base úmida. As temperaturas investigadas foram  $20$ ,  $25$  e  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ . Foram retiradas alíquotas em intervalos de tempo definidos durante a adsorção e a eluição. Após a adsorção, a resina foi lavada com 100 mL de água deionizada, antes da eluição da cef C com solução NaCl de 1%.

Após determinada as melhores condições, foram realizados estudos cinéticos de adsorção e dessorção com a solução de fase de topo do processo de extração pelos SDFA. Os experimentos

foram realizado no mesmo sistema, porém com volume de trabalho de 80 mL de solução de cef C e em pH 8,0 (pH da fase de topo). A massa de resina utilizada foi de 20 g em base úmida.

**Figura 5.1 - Aparato experimental utilizado nas cinéticas de adsorção e dessorção da cef C.**



### 5.3.2 Determinação das isotermas

As isotermas foram obtidas através de ensaios em batelada em mesa incubadora rotativa, a partir da solução da fase de topo do SDFa. Foram preparadas soluções com diferentes concentrações, e em cada solução foram adicionadas 0,7 g de resina adsorvente (base úmida). Os frascos contendo resina e solução de cef C foram agitados a 250 rpm. Após atingir o equilíbrio (1h), as concentrações finais de cef C foram analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência, obtendo-se as isotermas de equilíbrio.

### 5.3.3 Tratamento das resinas

Para os experimentos de cinética foram utilizadas três resinas de troca iônica: Amberlite IRA 400-Cl, Streamline Q XL e Streamline DEAE. As resinas foram tratadas de acordo com recomendação do fabricante.

#### a) Resina Amberlite IRA 400-Cl:

A resina Amberlite IRA 400-Cl foi regenerada com solução de NaCl (ciclo cloreto). Quando esta resina é regenerada com tal solução, é possível remover ânions mais seletivos, capazes de deslocar os íons cloreto da resina, tais como:  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{NO}_3^-$  e  $\text{PO}_4^{3-}$ . A resina foi regenerada com 10% (m/v) de solução de NaCl

por cerca de 1 hora, e em seguida lavada com água deionizada para retirada do excesso de sal.

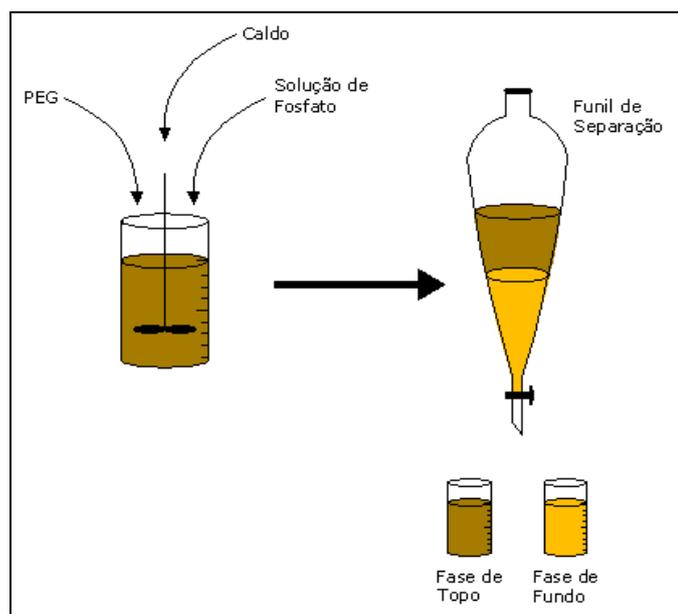
b) Resina Streamline Q XL e DEAE:

O tratamento das resinas Streamline Q XL e DEAE foi realizado com as soluções de NaOH 0,5 M e NaCl 1,0 M, a fim de dessorver compostos, e em seguida lavada com água para remover o excesso das soluções de NaOH 0,5 M e NaCl 1,0 M. Por fim, as resinas foram regeneradas com solução de ácido acético 25% v/v e novamente lavadas com água deionizada.

### 5.3.4 Extração por sistema de duas fases aquosas (SDFA)

A extração da cef C presente no caldo fermentado foi realizada por SDFA (PEG/fosfato) no melhor sistema definido no capítulo 4. Foram preparados sistemas de 100 gramas em pH 8, massa molecular de PEG 400, TLL 43 e rTLL de 1,00. Os sistemas foram agitados por aproximadamente 50 segundos e em seguida colocados em repouso, por 20 minutos, em um funil de separação, para separar as fases de topo e fundo. A fase topo foi reservada para utilização na etapa seguinte do trabalho, re-extração da cef C. Na Figura 5.2 está representada a montagem experimental do sistema de extração por SDFA de 100 g.

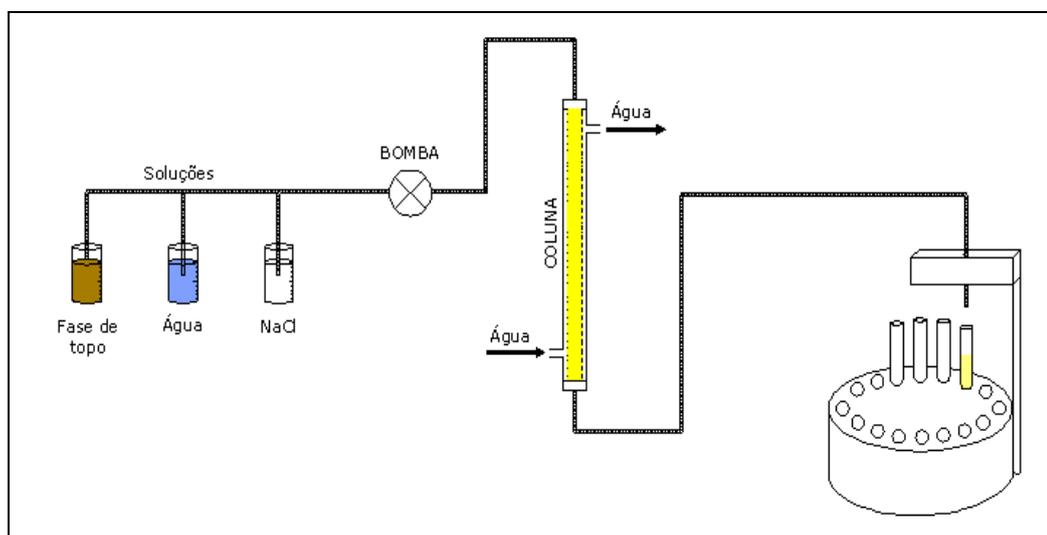
Figura 5.2 – Esquema do procedimento experimental de extração por SDFA.



### 5.3.5 Recuperação por troca iônica em coluna de leito fixo

A recuperação da cef C da fase de topo (PEG) foi realizada em coluna de vidro de leito fixo da Pharmacia Biotch modelo XK16 16/40 (1,6 x 40 cm), com um volume de leito de 40 mL de resina IRA 400 Cl<sup>-</sup>. A coluna foi alimentada com a solução de fase de topo (PEG + fosfato + cef C + aminoácidos), água e o eluente (solução de NaCl), com auxílio de uma bomba peristáltica, a uma vazão de 5 mL/min, conforme ilustrado na Figura 5.3.

Figura 5.3 - Esquema do procedimento experimental em coluna de leito fixo.



Os dois primeiros experimentos em coluna foram realizados para determinar a concentração da solução de NaCl na eluição da cef C e separação do PEG. O terceiro experimento foi realizado para verificar a separação da cef C dos aminoácidos e do sal de fosfato. Alíquotas de 5 e 20 mL foram coletadas após passarem pela coluna e as concentrações de cef C, PEG, fosfato e aminoácidos foram determinadas. O equilíbrio térmico da coluna foi mantido com o auxílio de um banho termostatizado a ela acoplado. Na Tabela 5.1 são apresentados os parâmetros operacionais utilizados nos três experimentos em coluna de leito fixo para re-extração da cef C da fase de topo.

**Tabela 5.1 - Parâmetros operacionais dos ensaios realizados em coluna de leito fixo.**

Experimentos	Volume de Topo	C <sub>0</sub> de cef C (fase de topo)	Lavagem	Eluição
Ensaio 1	43 mL	227,58 mg/L	100 mL de água	Linear - 500 mL (0-10% de NaCl)
Ensaio 2	43 mL	261,61 mg/L	100 mL de água	Degrau – 200 mL (1, 2, 3 e 4% de NaCl)
Ensaio 3	40 mL	145,35 mg/L	100 mL de água	Degrau – 200 mL (1, 2, 3 e 4% de NaCl)

A análise dos resultados foi obtido pelo fator de purificação (*FP*) do sistema foi definido de acordo com a Equação (5.1), onde *C*<sub>0</sub> e *I*<sub>0</sub> são as concentrações iniciais da cefamicina C e contaminantes, respectivamente, e *C*<sub>f</sub> e *I*<sub>f</sub> são as concentrações finais da cefamicina C e contaminantes.

A quantidade de massa de cef C adsorvida por massa de resina (*q*<sub>eq</sub>) em (mg/g) é definida pela Equação (5.2), onde *C*<sub>0</sub> e *C*<sub>eq</sub> são as concentrações iniciais e no equilíbrio, respectivamente, *V*<sub>sol</sub> é o volume de solução e *m*<sub>res</sub> é a massa de resina.

$$FP = \frac{C_f \cdot I_0}{C_0 \cdot I_f} \quad (5.1)$$

$$q_{eq} = \frac{(C_0 - C_{eq})}{m_{res}} \cdot V_{sol} \quad (5.2)$$

## 5.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.4.1. Determinação da resina de troca iônica

Como etapa preliminar deste trabalho, foi realizado o estudo da adsorção da cef C utilizando-se as resinas de troca iônica (IRA-400, QXL e DEAE), nas temperaturas 20, 25 e 30 °C, e pH 2,8 e 6,8. Para definir a melhor resina calculou-se *FP*, *C*<sub>eq</sub>, e *q*<sub>eq</sub> em todas as condições pré-estabelecidas de operação. Os resultados obtidos são apresentados nas Tabelas 5.2 a 5.4.

Na Tabela 5.2 são apresentados os valores obtidos nos experimentos realizados com a resina IRA 400. Observa-se que os melhores resultados de *q*<sub>eq</sub> e *FP* foram obtidos em pH 6,8, onde a quantidade de cef C adsorvida por massa de resina foi entre 0,15 e 0,20 mg/g e o

fator de purificação 2,0. Na faixa de temperatura estudada, observou-se maior adsorção da cefamicina C na temperatura de 25°C.

**Tabela 5.2 - Resultados obtidos de FP,  $C_{eq}$ , e  $Q_{eq}$  para as cinéticas de adsorção e dessorção para a cefamicina C, em pH 2,8 e 6,8 e temperaturas de 20, 25 e 30 °C para resina Amberlite IRA 400.**

pH	T (°C)	$C_{eq}$ (mg/L)	$q_{eq}$ (mg/g)	FP
2,8	20	29,3	0,09	1,0
	25	35,7	0,08	1,9
	30	20,4	0,07	0,7
6,8	20	43,9	0,15	2,0
	25	64,6	0,20	2,0
	30	62,0	0,18	2,0

Na Tabela 5. 3, são apresentados os valores dos experimentos realizados com a resina Streamline DEAE, verificou-se que o melhor resultado de  $q_{eq}$  foi obtido em pH 6,8 e na temperatura de 25 °C e FP de 1,6.

**Tabela 5. 3 - Resultados obtidos de FP,  $C_{eq}$ , e  $Q_{eq}$  para as cinéticas de adsorção e dessorção para a cefamicina C, em pH 2,8 e 6,8 e temperaturas de 20, 25 e 30 °C para resina Streamline DEAE.**

pH	T (°C)	$C_{eq}$ (mg/L)	$q_{eq}$ (mg/g)	FP
2,8	20	56,7	0,11	1,7
	25	47,1	0,02	1,9
	30	94,9	0,09	1,4
6,8	20	26,1	0,07	1,3
	25	59,9	0,12	1,6
	30	69,0	0,07	1,1

Na Tabela 5.4 observa-se que os resultados para a resina Streamline Q XL não houve diferença significativa entre os dois pHs estudados.

**Tabela 5.4 - Resultados obtidos de FP,  $C_{eq}$ , e  $Q_{eq}$  para as cinéticas de adsorção e dessorção para a cefamicina C, em pH 2,8 e 6,8 e temperaturas de 20, 25 e 30 °C para resina Streamline Q XL.**

pH	T (°C)	$C_{eq}$ (mg/L)	$Q_{eq}$ (mg/g)	FP
2,8	20	55,5	0,14	1,7
	25	50,2	0,11	1,3
	30	49,9	0,17	1,4
6,8	20	51,7	0,16	1,1
	25	54,9	0,13	1,5
	30	53,6	0,21	1,7

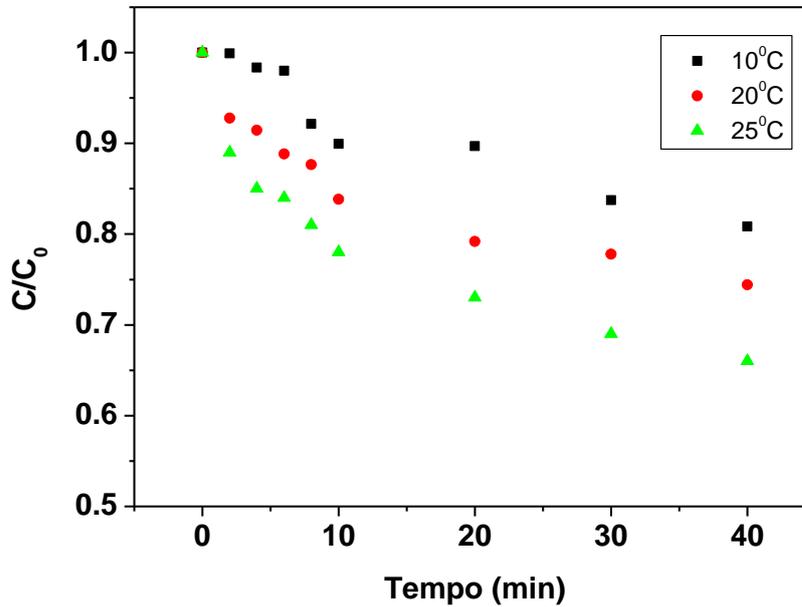
Após a análise das Tabela 5. 3 a 5.4, onde foram apresentados os resultados das cinéticas de adsorção das resinas avaliadas, optou-se pela resina Amberlite IRA 400 para desenvolver a etapa posterior deste trabalho, visto que com esta resina foram obtidos os melhores valores de  $q_{eq}$  e FP, nas mesmas condições de pH e temperatura (6,8 e 25 °C).

#### **5.4.2. Cinéticas de adsorção e dessorção na solução de fase de topo (PEG 400)**

Os experimentos em reator descontínuo foram realizados com 20 g de resina Amberlite IRA400 em base úmida e 80 mL de fase de topo (PEG-400) obtida conforme descrito no item 5.3.4. Após a lavagem da resina com 100 mL de água deionizada foi realizada a eluição com 80 mL solução de NaCl 1% (p/v).

As cinéticas de adsorção e dessorção foram realizadas, sob diferentes temperaturas (10, 20 e 25 °C). Nas Figura 5.4 e 5.5 são apresentados os perfis das concentrações adimensionais da adsorção e dessorção da cef C, respectivamente, em função do tempo.

Figura 5.4 – Curvas cinéticas de adsorção da cefamicina C na solução de fase de topo (pH 8), nas temperaturas de 10, 20 e 25 °C.



A partir da Figura 5.4, observa-se uma menor adsorção da cef C na temperatura de 10 °C, devido ao aumento da viscosidade da solução, conseqüentemente, uma maior resistência a transferência de massa da cef C na resina. Enquanto que na temperatura de 25 °C, o aumento da temperatura diminuiu a viscosidade da solução e aumentou adsorção da cef C na resina. A Figura 5. mostra que a dessorção da cef C sofreu pouco influência da temperatura na faixa estudada.

A quantidade de cef C adsorvida por massa de resina ( $q_{eq}$ ) em função do tempo está demonstrada na Figura 5.6.

Figura 5.5 - Curvas cinéticas de dessorção da cefamicina C na solução de fase de topo (pH 8) nas temperaturas de 10, 20 e 25 °C).

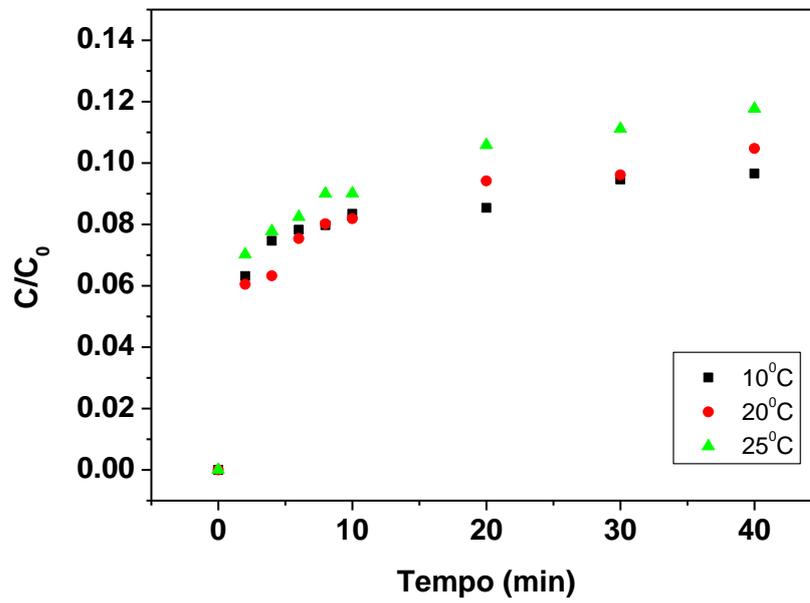
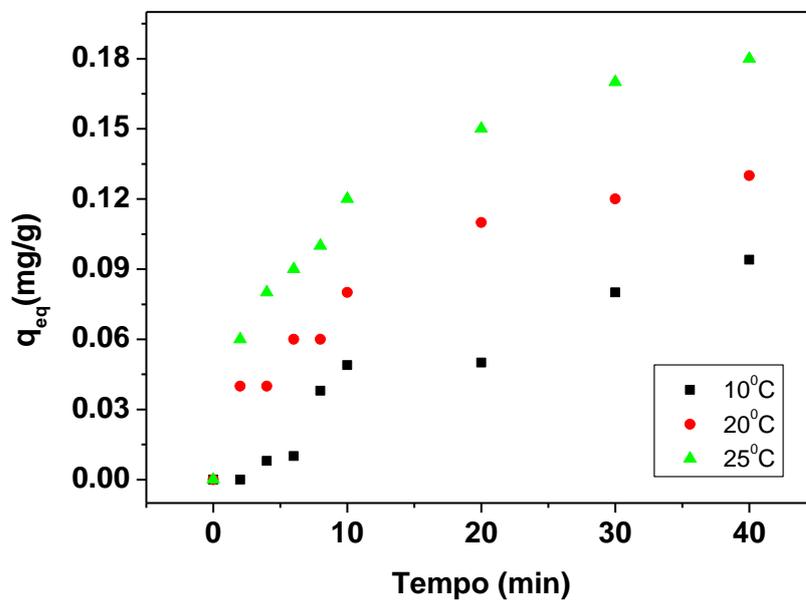


Figura 5.6 – Quantidade de cefamicina C adsorvida por massa de resina em função do tempo, na solução de fase de topo (pH 8) nas temperaturas de 10, 20 e 25 °C.



### 5.4.3. Isoterma de adsorção na solução de fase de topo (PEG 400)

Matematicamente, no equilíbrio, é possível relacionar a quantidade de cef C adsorvida por massa de resina ( $q_{eq}$ ), em função da concentração de cef C ( $C_{eq}$ ) na solução. A expressão que relaciona estes parâmetros é denominada isoterma de adsorção. Neste trabalho utilizaram-se os modelos de Langmuir e de Freundlich, representados pelas Equações 5.8 e 5.9, respectivamente.

A isoterma de Langmuir assume a formação de uma camada homogênea na superfície sólida, sem que haja interações entre as moléculas adsorvidas.

$$q_{eq} = q_m \frac{C_{eq}}{K_L + C_{eq}} \quad (5.8)$$

onde  $q_m$  é a capacidade máxima de adsorção e  $K_L$  é a constante de equilíbrio da isoterma de Langmuir (afinidade do composto de interesse pela fase sólida). Essa isoterma assume calor de adsorção constante, um número finito de sítios e a existência de ponte de interação entre soluto-soluto, resultando em um recobrimento em monocamada.

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

$$q_{eq} = K_F \cdot C_{eq}^{\frac{1}{n}} \quad (5.9)$$

onde  $K_F$  é a constante de adsorção da isoterma de Freundlich e  $n$  é um índice desta isoterma. A magnitude do expoente  $n$  dá uma indicação sobre a favorabilidade de adsorção. Os valores de “ $n$ ” na faixa de 2-10 representam boa adsorção, 1-2 moderada adsorção e menores que 1 uma baixa adsorção (HAMDAOUI; NAFFRECHOUX, 2007).

Na Figura 5.7 é apresentada a isoterma de equilíbrio de adsorção da cef C na resina Amberlite IRA-400. A partir dos dados experimentais e baseado nos modelos de Langmuir e Freundlich foi realizada uma regressão não-linear. Os parâmetros de cada modelo estão apresentados na Tabela 5.5.

Figura 5.7 - Isoterma de equilíbrio de adsorção da cef C a 25° C, solução de fase de topo (pH 8), na resina Amberlite IRA-400 Cl.

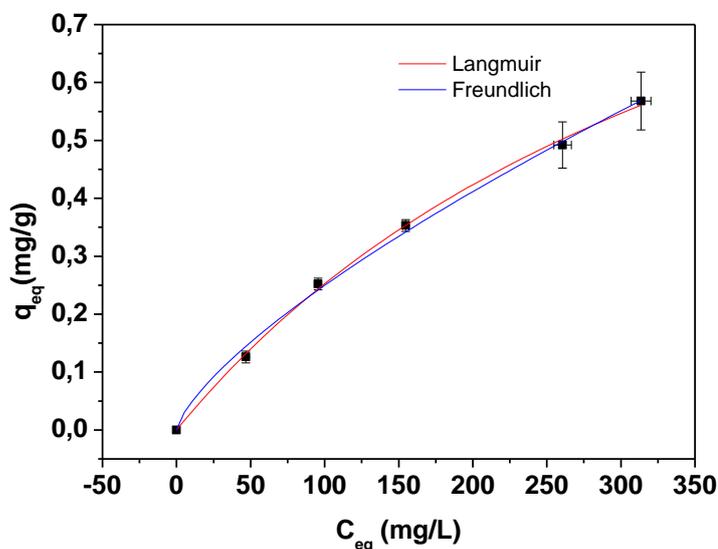


Tabela 5.5 - Parâmetros da isoterma de Langmuir e de Freundlich determinados por regressão linear na fase de topo (PH 8,0) a 25 °C, em resina IRA 400 Cl.

Modelo de Langmuir		
$q_m$ (mg <sub>cefC</sub> ·g <sub>res</sub> <sup>-1</sup> )	$K_L$ (mg·L <sup>-1</sup> )	R <sup>2</sup>
1,30 ± 0,09	418,06 ± 45,80	0,99
Isoterma de Freundlich		
$n$ (-)	$K_F$ (mg <sup>1-(1/n)</sup> L <sup>1/n</sup> g <sup>-1</sup> )	R <sup>2</sup>
1,38 ± 0,03	0,009 ± 0,001	0,99

Ambos os modelos descrevem adequadamente o comportamento de equilíbrio de adsorção da cef C sobre a superfície da resina Amberlite IRA-400 Cl. Sob o ponto de vista termodinâmico, a adsorção por troca iônica pode ser adequadamente descrita como sendo em uma série de camadas, tendo em vista a força eletrostática exercida pelos sítios carregados, nas moléculas adjacentes. A adsorção em monocamada, descrita pelo modelo de Langmuir pode não representar fisicamente o fenômeno, no entanto, matematicamente ela representa satisfatoriamente a adsorção e permite a simplificação de modelos que descrevem os processos de adsorção.

Barboza et al. (2002c) estudou a adsorção da cefalosporina C na resina aniônica Amberlite XAD-2, onde foi proposto um modelo misto utilizando os modelos de isoterma de Langmuir e Freundlich. Os resultados obtidos de  $K_L$  e  $n$ , na temperatura de 25 °C, foram de

450 mg. L<sup>-1</sup> e 1,43, respectivamente. Os resultados obtidos para a cefamicina C (Tabela 5.5) foram muito próximos aos obtidos pelo autor para a cefalosporina C.

Entretanto, quando se compara os resultados de  $q_m$  e  $K_L$  para a cefamicina C, com os resultados obtidos na literatura para o ácido clavulânico, por Barboza et al. (2002a) na ordem de grandeza de ( $10^1$ ), verifica-se que o resultado de  $q_m$  foi muito inferior e de  $K_L$  muito alto. Tal comportamento pode ser devido à presença dos sais de fosfato e PEG presentes na fase de topo. Os ânions dos sais de fosfato competem com os ânions da cef C pelos sítios ativos livres da resina, diminuindo a sua capacidade de adsorção. O alto valor de  $K_L$  obtido pode ser devido à maior afinidade da resina pelos íons do sal de fosfato, entre outros compostos e à interação entre o PEG e a cef C.

Os resultados de  $K_L$  obtidos por Rodriguez (2011), com a resina Streamline Q XL para a cef C foram 100 vezes menores que os obtidos neste trabalho, ressaltando a hipótese que a presença do sal de fosfato e do PEG na fase de topo interferem na afinidade da resina pela cef C.

#### **5.4.4. Recuperação da cefamicina C do PEG 400 por troca iônica em coluna de leito fixo**

Foram realizados três experimentos em coluna de leito fixo, para a recuperação da cef C da fase de topo, com a resina de troca iônica Amberlite IRA-400. No primeiro experimento (Figura 5.8) foi realizada uma eluição linear, a fim de determinar a concentração adequada de NaCl, para eluir a cef C da coluna. Verificou-se que a cef C começou a ser desorvida em concentrações de NaCl a partir de 1%. Nos experimentos posteriores utilizou-se uma eluição do tipo degrau, com concentrações de NaCl de 1, 2, 3 e 4% (Figura 5.8 a Figura 5.6).

Após a análise das Figura 5.8 e 5.9 observou-se que a desorção da cef C foi mais eficiente com a eluição degrau, pois o pico foi mais estreito quando comparado ao pico obtido na eluição linear. Foram obtidos baixos fatores de concentração na eluição, devido a presença do sal de fosfato na fase de topo o que diminui a capacidade de adsorção da cef C.

Nas Figuras 5.8 e 5.9 observou-se também que não ocorreu a adsorção do PEG 400 nos sítios ativos resina, devido ao PEG não apresentar cargas livres. Deste modo o PEG não compete com a adsorção da cef C na resina e o mesmo foi completamente eliminado da coluna, durante a etapa de lavagem com água. A etapa de eluição mostra que mesmo a após a

saída do PEG, a cef C permaneceu adsorvida e somente foi eluída da coluna com a solução de NaCl de 1% (p/v), confirmando que a cefamicina C foi separada do PEG-400.

Figura 5.8 - Perfil de adsorção e dessorção da cef C e PEG em coluna de leito fixo (eluição linear).

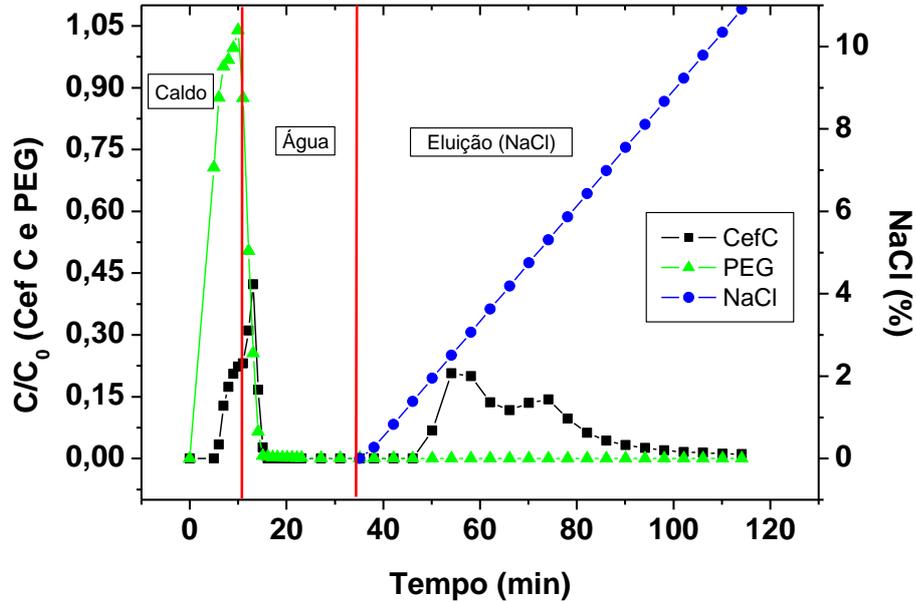
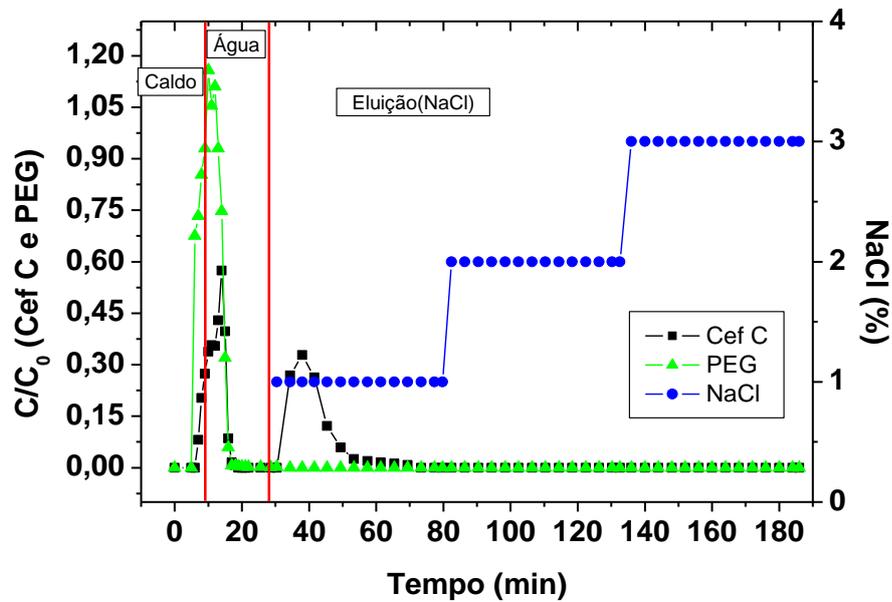


Figura 5.9 - Perfil de adsorção e dessorção da cef C e PEG em coluna de leito fixo (eluição degrau).

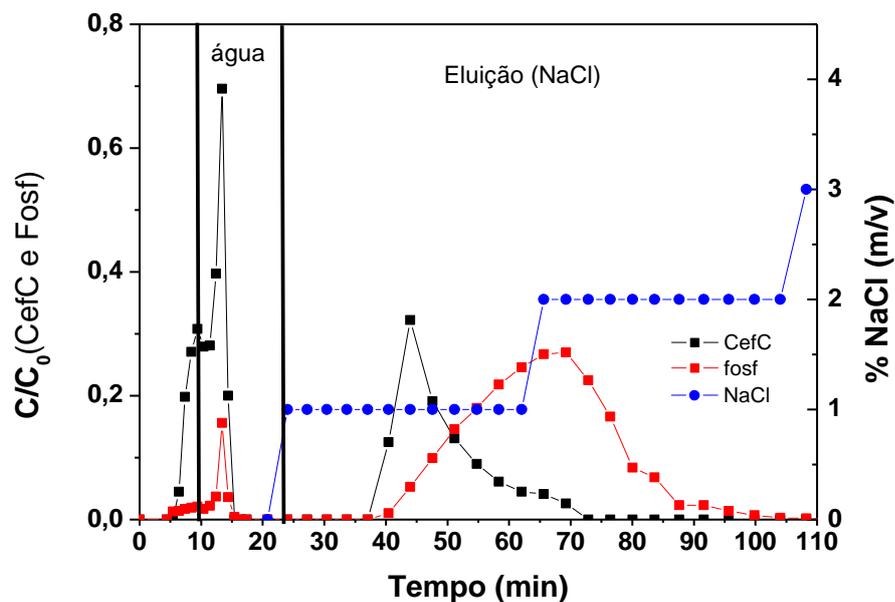


Na sequência do trabalho foi avaliada a recuperação da cef C, em relação aos aminoácidos e ao fosfato, por troca iônica em coluna de leito fixo. Os resultados obtidos estão demonstrados nas Figura 5.10 a Figura 5.6.

Observa-se na Figura 5.10 que a adsorção do sal de fosfato e da cef C ocorreram simultaneamente, na resina Amberlite IRA-400 Cl<sup>-</sup>, evidenciando que os ânions do sal de fosfato competem na adsorção entre a cef C pelos íons Cl<sup>-</sup> da resina.

Na etapa de dessorção, os dois compostos começaram a ser eluídos ao mesmo tempo, em 40 minutos aproximadamente. Entretanto, as concentrações máximas de cef C e sal de fosfato ocorreram em 43 e 68 minutos, respectivamente, de maneira que não foi possível separar a cef C do sal de fosfato na eluição. Durante o processo de eluição foi obtido um baixo fator de concentração de cef C, devido a presença do sal de fosfato na fase de topo o que diminui a adsorção da cef C.

Figura 5.10 - Perfil de adsorção e dessorção da cef C e fosfato em coluna de leito fixo.

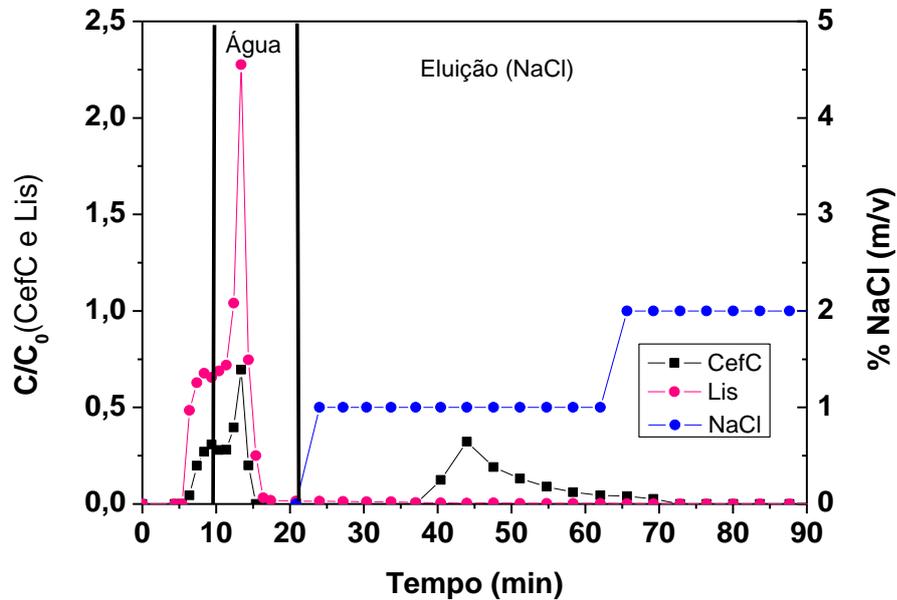


Nas Figura 5.4 a Figura 5.6 são apresentados os perfis de adsorção e dessorção dos aminoácidos (lisina, ornitina e asparagina) e da cef C, em coluna de leito fixo.

Na Figura 5.4 pode-se observar que não houve a adsorção do aminoácido na resina, e este foi completamente eliminado da coluna durante a etapa de lavagem com água. Este comportamento se deve ao aminoácido lisina estar na forma de cátion no pH de 8,0, pois o seu ponto isoelétrico é de 9,73 (LEHNINGER, 1993), não ocorrendo a adsorção da lisina nos

sítios ativos da resina aniônica. Enquanto que a cef C na forma de ânion adsorveu na resina, devido estar acima do seu ponto isoelétrico de 3,5, conforme Pines, (1973).

Figura 5.4 - Perfil de adsorção e dessorção da cef C e lisina em coluna de leito fixo.



Nas Figura 5.5 e Figura 5.6 pode-se observar o comportamento dos aminoácidos ornitina e asparagina na etapa de adsorção, onde os mesmos não foram adsorvidos na resina e foram totalmente eliminados da coluna na etapa de lavagem com água. Mostrando que a cef C possui maior afinidade pela resina Amberlite IRA-400 do que os aminoácidos ornitina e asparagina.

Figura 5.5 - Perfil de adsorção e dessorção da cef C e ornitina em coluna de leito fixo.

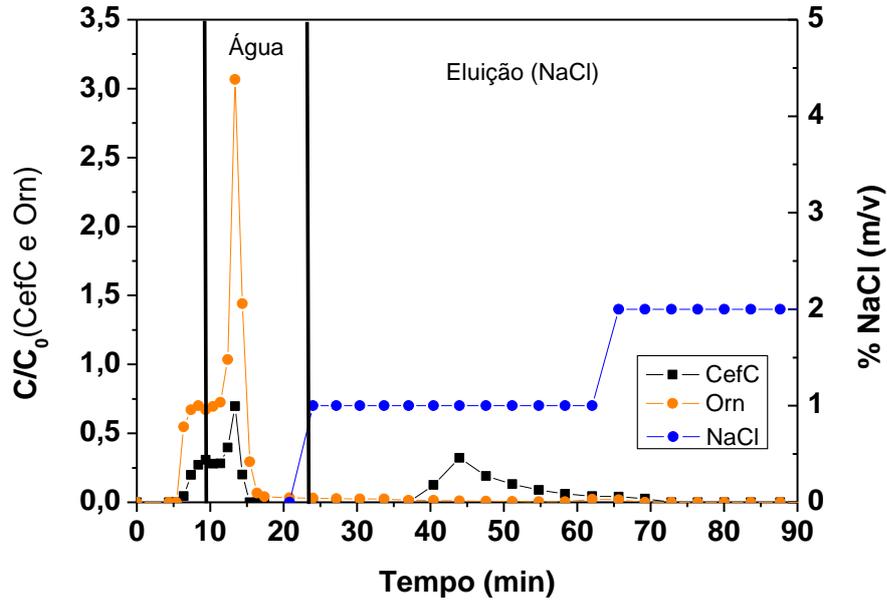
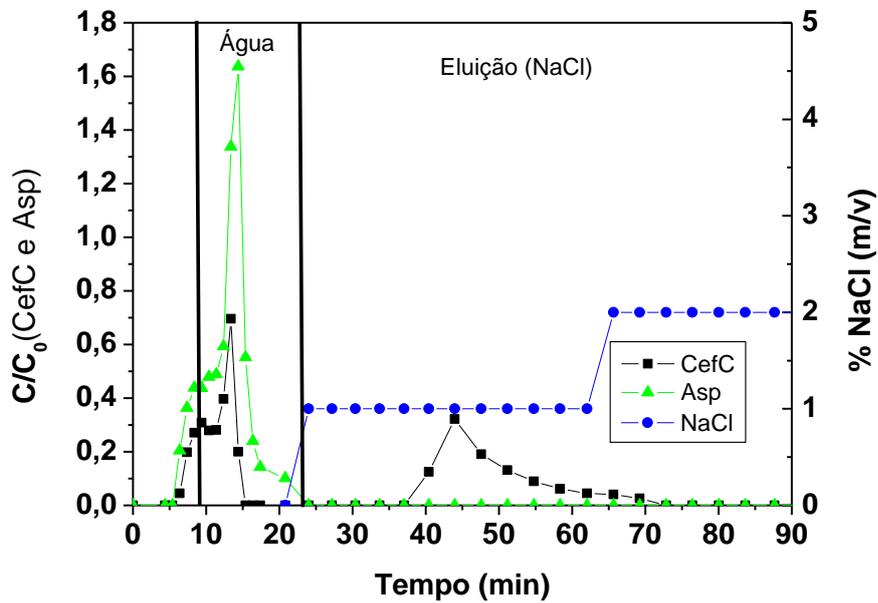


Figura 5.6 - Perfil de adsorção e dessorção da cef C e asparagina em coluna de leito fixo.



Na Tabela 5.6 são apresentados os resultados de fator de purificação (FP) da cef C, em relação aos aminoácidos e o sal de fosfato, conforme a equação 5.1.

**Tabela 5.6– Fator de purificação (FP) da cef C em relação ao fosfato e aos aminoácidos (asparagina, ornitina e lisina) em coluna de leito fixo.**

<b>Composto</b>	<b>FP Fração (43 min.)</b>
Fosfato	3,26
Asparagina	Alto
Ornitina	Alto
Lisina	Alto

Após a análise dos dados apresentados na Tabela 5.6 e das Figuras 5.11 a 5.13, onde se verificou a separação da cef C dos aminoácidos avaliados, percebe-se que os resultados obtidos de FP foram satisfatórios. Em relação ao sal de fosfato, o resultado obtido de FP não se mostrou satisfatório, uma vez que a separação entre o composto e a cef C não ocorreu.

Os resultados de fator de purificação mostraram-se compatíveis aos resultados obtidos por Silva et al. (2012). Os autores realizaram experimentos de re-extração por troca iônica, do ácido clavulânico de uma solução de fase de topo em relação aos aminoácidos presentes (lisina, tirosina, prolina e histidina), utilizando a resina Amberlite IRA-400. Os valores de purificação obtidos foram de 100% para lisina, tirosina e histidina. Em relação ao aminoácido prolina, o fator de purificação obtido foi 4,1.

## 5.5 CONCLUSÃO

O processo proposto para a recuperação da cefamicina C da fase de topo, por cromatografia de troca iônica em coluna de leito fixo, mostrou-se viável e satisfatório, haja vista os altos valores de fator de purificação obtidos na separação entre a cef C, o PEG e os aminoácidos (ornitina, asparagina e lisina). Verificou-se que a resina Amberlite IRA-400 Cl<sup>-</sup> é eficiente para o processo de recuperação.

Os resultados obtidos em coluna de leito fixo, referentes ao fator de purificação da cefamicina C, em relação aos demais compostos presentes na fase de topo foram: 3,26 e alto para os aminoácidos (asparagina, ornitina e lisina). O baixo valor obtido de fator de purificação entre o sal de fosfato e a cefamicina C deve-se à adsorção do sal na resina, pois este também possui afinidade pela mesma, competindo com a cefamicina C durante o processo de adsorção.

## 5.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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.

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 Cephamicin C Purification Technique. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 166, p. 208-221, 2012a.

BAPTISTA NETO, A.; OLIVEIRA, J. H. H. L. ; BELLÃO, C.; BADINO, A. C. ; BARBOZA, M. ; BELLÃO, C. ; BARBOZA, M.; HOKKA, C. O. An alternative methodology for determination of cephamycin C from fermentation broth, *Journal of Chromatography and Separation Techniques*. 3, pp. 1-5, 2012b.

BARBOZA, M.; ALMEIDA, R. M. R. G. ; HOKKA, C.O. Kinetic studies on clavulanic acid recovery by ion exchange chromatography. *Bioseparation* (Dordrecht), HOLANDA, v. 10, p. 221-227, 2002a.

BARBOZA, M.; ALMEIDA, R. M. R. G. ; HOKKA, C.O. Intrinsic kinetic parameters of clavulanic acid adsorption by ion exchange by ion exchange chromatography. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, ESTADOS UNIDOS, v. 41, n. ISS23, p. 5789-5793, 2002b.

BARBOZA, M.; HOKKA, C. O.; MAUGERI FILHO, F. Continuous cephalosporin C purification: dynamic modeling and parameter validation. *Bioprocess and Biosystems Engineering* (Print), v. 25, p. 193-203, 2002.

BELLÃO, C.; BAPTISTA NETO, A.; BADINO JR, A. C. Avaliação de meios de Cultura para a Produção de Cefamicina C por *Streptomyces clavuligerus* em Batelada. *anais do XVI Simpósio Nacional de Bioprocessos*. Curitiba-PR, 2007.

BORA, M.M.; BORTHAKUR, S.; RAO, P.C.; DUTTA, N.N. Aqueous two-phase partitioning of cephalosporin antibiotic: effect of solute chemical nature. *Separation and Purification Technology*, v.45, p. 153-156, 2005.

CHAUBAL, M.V., PAYNE, G.F., REYNOLDS, C.H., ALBRIGHT, R.L. Equilibria for the adsorption of antibiotics onto neutral polymeric sorbents: experimental and modelling studies. *Biotechnol Bioeng* 47:215–226, 1995.

FRANCO, T. T.; KILIKIAN, B. V.; COIMBRA, J. S. R.; MEIRELLES, A. J. A. Extração líquido-líquido em sistemas de duas fases aquosas. In: Pessoa Jr. A.; Kilikian, B. V. Purificação de produtos biotecnológicos, 1ª ed. Barueri-SP, Manole, p. 114-165, 2005.

HAMDAOUI, O., NAFFRECHOUX, E. Modeling of adsorption isotherms of phenol and chlorophenols onto granular activated carbon Part I. Two-parameter models and equations allowing determination of thermodynamic parameters. Journal of Hazardous Materials, v. 147, p. 381-394, 2007.

HENRIKSON, R. L.; MEREDITH, S. C. Amino acid analysis by reverse phase high performance liquid chromatography pre column derivatization with phenylthiocyanate analytical, Biochemistry, v.13, p. 65-72, 1984.

HIRATA, B. D. Produção de ácido clavulânico em batelada alimentada por *Streptomyces clavuligerus* e extração em sistemas de duas fases aquosas. São Carlos DEQ-UFSCar, (Dissertação de Mestrado) 2003.

KAMOGASHIRA, T., TSUTOMU, N., SUGAWARA, M., NIHNO, T., TAKEGATA, S. *Patente Nº 4.332.891*. United States, 1982.

KUHN, R. C. e MAUGERI, F. F. Separation of fructooligosaccharides using zeolite fixed bed columns. Journal of Chromatography B, v.878, p. 2023-2028, 2010.

LEE, J.W., PARK, H.C., MOON, H. Adsorption and desorption of cephalosporin C on non-ionic polymeric sorbents. Sep. Purif. Technol. 12:1-11, 1997.

LEHNINGER, A. L., 1917-. Principles of biochemistry: with an extended discussion of oxygen-binding proteins. 2 ed. New York: Worth, 1013 p., 1993.

LIN, PO-C.; CHU, I-M. Separation of cephalosporin C and desacetyl cephalosporin C by high speed counter-current chromatography in aqueous two-phase systems. Biotechnology Techniques August 1995, Volume 9, Issue 8, pp 549-552, 1995.

LU, T. S., LEE, T. Y., Separation of diethylbenzene isomers by column adsorption and desorption. Ind. Eng. Chem. Res. 26 (10), 2024-2028, 1987.

MAYER, A. F.; ANSPANCH, F. B.; DECKWER, W. D. Purification clavulanic acid by ion-pairing systems, Bioseparation, v6, p.25-39, 1996.

OMSTEAD, D. R.; HUNT, G. H.; BUCKLAND, B. C. Commercial production of cephamycin antibiotics. In: Moo-Young, M. Comprehensive biotechnology, vol. 3 (The practice of biotechnology: current commodity products), cap. 9, p. 187, Pergamon Press. Inc., USA, 1985.

PESSOA JR. A. e KILIKIAN, B. V. Introdução. In: Pessoa Jr. A.; Kilikian, B. V. Purificação de produtos biotecnológicos, 1ª ed. Barueri-SP, Manole, p. 114-165, 2005.

PINES, M. H. *Patente N° 3.983.108*. United State, 1976.

RODRIGUEZ, G. Y.; Estudo da Cinética e do Equilíbrio da Adsorção da Cefamicina C em Resina de troca iônica e Simulação do Processo Contínuo. São Carlos: Dissertação de Mestrado, 2011.

SCHUBERT, P. *FPatente N° 4.196.285*. United States, 1980.

SILVA, C. S.; BAVAROTI, E.; RODRIGUES, M. I.; HOKKA, C.O.; BARBOZA, M. Evaluation of the effects of the parameters involved in the purification of clavulanic acid from fermentation broth by aqueous two-phase systems. *Bioprocess and Biosyst. Eng.* 2008.

SILVA, C. S.; RODRIGUES, Y.R.; HOKKA, C.O.; BARBOZA, M. Study of Fouling Index in Tangential Filtration Applied for Separation of Clavulanic Acid from Fermentation Broths. In: Antonio Mendez-Vilas. (Org.). *Current Research Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*. World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd., Sevilha, pp. 765-777, 2009.

SILVA, C. S.; CUEL, M. F.; BARRETO, V. O.; KWONG, W. H.; HOKKA, C. O.; BARBOZA, M. Separation of clavulanic acid from fermented broth of amino acids by aqueous two-phase system and ion-exchange adsorption. *New Biotechnology*, v.29, n° 3, p. 428-431, 2012.

VIDEIRA, M.; & AIRES-BARROS, M. R. - Liquid-liquid extraction of clavulanic acid using an aqueous two-phase system of polyethylene glycol and potassium phosphate. *Journal of Chromatography A*, v. 668, pp. 237-240, 1994.

VOGEL, A. I. *Textbook of practical organic chemistry*. 5ed. New York, Logman Scientific & Technical, 1989.

YANG, W., LIN, C.; CHU, I.; LEE, C. Extraction of cephalosporin C from whole broth and separation of desacetyl cephalosporin c by aqueous two-phase partition. *Biotechnology and Bioengineering*, v.43, p.439-445, 1994.

# CAPÍTULO 6

**Conclusões Gerais**

Ao final dos experimentos realizados e apresentados neste trabalho foi possível obter algumas importantes informações a respeito do desenvolvimento de um processo de extração, separação e purificação da cefamicina C, as quais são apresentadas a seguir:

#### **A) Estudo cinético da degradação da cefamicina C.**

Nos estudos de degradação da cefamicina C em solução aquosa, constatou-se maior estabilidade do composto na faixa de pH entre 3,3 e 7,6. Foi verificado que as constantes parciais de hidrólise da cefamicina C são muito elevadas em soluções básicas, diferentemente das constantes observadas em meios ácidos. A faixa de estabilidade determinada para a cefamicina C é semelhante à faixa de estabilidade encontrada na literatura para a cefalosporina C ( $3,0 \leq \text{pH} \leq 8,0$ ).

#### **B) Separação da cefamicina C de aminoácidos por sistema de duas fases aquosas**

Os experimentos permitiram concluir que o coeficiente de partição aumenta com a diminuição da massa molecular de PEG. Em relação ao pH, verificou-se que o  $k_p$  apresentou maiores valores em meios mais alcalinos. A melhor composição do sistema de duas fases aquosas, para a extração da cef C do caldo fermentado foi obtida nas seguintes condições: PEG 400, pH 8, TLL 43 e rTLL 1, onde se obteve o coeficiente de partição, 5,57.

O sistema de duas fases aquosas adotado neste trabalho, composto por PEG e fosfato, utilizado para promover a separação entre a cefamicina C e os aminoácidos residuais (ornitina, lisina e asparagina) presentes no caldo ultrafiltrado, mostrou-se eficiente em baixas concentrações destes compostos. O maior coeficiente de partição obtido para a cefamicina C, em relação aos aminoácidos, foi 1,73. Os valores de fator de purificação obtidos para a cefamicina C, em relação aos aminoácidos (ornitina, lisina e asparagina) foram altos, uma vez que ocorreu a separação total entre os compostos.

### **C) Recuperação da cefamicina C absorvida na fase PEG utilizando cromatografia de troca iônica**

Dentre os estudos cinéticos realizados, constatou-se que os melhores resultados de adsorção foram obtidos para a resina Amberlite IRA 400 na temperatura de 25°C e pH 6,8.

A recuperação da cefamicina C da solução da fase de topo por cromatografia de troca iônica em coluna de leito fixo, mostrou-se eficiente para recuperar a cef C do PEG, promovendo a separação entre estes compostos. Em relação ao fosfato, obteve-se o fator de purificação de 3,26 vezes e, diante dos aminoácidos a purificação foi de 100%.

Diante dos resultados obtidos neste trabalho, é possível inferir que a seqüência de etapas proposta para o processo de extração e purificação da cef C, após as operações de microfiltração e ultrafiltração, constituída pelo processo de extração líquido-líquido em um sistema de duas fases aquosas (SDFA), seguida da recuperação da cef C da fase de topo, por adsorção com resina de troca iônica, mostrou-se adequada ao objetivo proposto.

#### **Sugestões para trabalhos futuros**

Tendo em vista os resultados obtidos e as conclusões geradas a partir destes resultados, algumas sugestões podem ser apresentadas para futuros trabalhos que venham a ser desenvolvidos sobre a purificação da cefamicina C.

- Estudar a degradação da cefamicina C em outras temperaturas;
- Estudar outras composições de SDFA composto por PEG e sais como Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e MgSO<sub>4</sub>;
- Estudar a extração e purificação da cef C com massa molecular de PEG inferior a 400;
- Estudar a precipitação do sal da fase de topo do SDFA, de modo a avaliar a eficiência na recuperação da cef C por troca iônica;
- Estudar outras resinas para a adsorção da cef C;
- Estudar outros eluentes para a troca iônica.