

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

Separação e Purificação do Ácido Clavulânico através de Extração Líquido - Líquido seguida de Adsorção em Coluna de Leito Fixo.

**Luciana Machado Brites**

**SÃO CARLOS, OUTUBRO DE 2005.**

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

Separação e Purificação do Ácido Clavulânico através de Extração Líquido - Líquido seguida de Adsorção em Coluna de Leito Fixo.

**Luciana Machado Brites**

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

Trabalho apresentando ao Programa de Pós-Graduação no Exame de Qualificação - requisito necessário para a obtenção do título de Mestre em Engenharia Química. Área de Concentração: Pesquisa e Desenvolvimento de Processos Químicos.

**SÃO CARLOS, OUTUBRO DE 2005.**

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

B862sp

Brites, Luciana Machado.

Separação e purificação do ácido clavulânico através de extração líquido-líquido seguida de adsorção em coluna de leito fixo / Luciana Machado Brites. -- São Carlos : UFSCar, 2006.

85 p.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2005.

1. Engenharia bioquímica. 2. Purificação de antibióticos. 3. Ácido clavulânico . 4. Troca iônica. 5. Extração líquido-líquido. I. Título.

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

## DEDICATÓRIA

*À minha mãe e avó... Pelo carinho e incentivo que sempre me deram durante todos esses anos de estudo. A vocês que se doaram inteiras e renunciaram aos seus sonhos para que muitas vezes eu pudesse realizar os meus sonhos... não bastaria um muitíssimo obrigado.*

*Ao meu namorado Denyson... Pelo carinho, apoio e compreensão nos momentos difíceis e principalmente pelo amor.*

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, por ter me dado forças para vencer os obstáculos, por ter-me feito forte e, se consegui atingir esse ideal, mais do que tudo, devo ao Senhor.

À minha família pelo apoio e incentivo dados no transcorrer de todos esses anos.

Ao professor Dr. Marlei Barboza pela orientação deste trabalho, amizade demonstrada e pela enorme paciência na revisão do texto da dissertação.

Ao Professor Dr. Carlos Osamu Hokka pela orientação, atenção, paciência e amizade durante esses anos de trabalho.

Ao professor Dr. Alberto Colli Badino Junior pela orientação e incentivos prestados que ajudaram a compor esse trabalho.

Ao Dr. Álvaro pela importante ajuda, atenção e paciência, às alunas de iniciação científica Marina e Amanda pelo companheirismo e ajuda nos experimentos e a todos os amigos do laboratório, Amadeus, Marcel, Juliana, Sheila, Vanessa, Daniela, Kamilla e Izara.

Às meninas da república Adriana, Ana Elisa, Cristiane, Vanessa, Patrícia e Iara pela amizade e companheirismo.

Às amigas Jaimara e Raphaella pela amizade e companheirismo.

## RESUMO

Propôs-se e estudou-se a extração do ácido clavulânico do meio fermentado, sua concentração e purificação, através da comparação de dois métodos de extração líquido-líquido, seguida de adsorção em coluna de leito fixo com as resinas (polimérica hidrofóbica e de troca iônica). As etapas de extração e adsorção, propostas neste trabalho, foram avaliadas em termos do Rendimento (R), o fator de purificação (FP) e o fator de concentração (FC). Para isso foram realizadas extrações com vários solventes orgânicos, sendo estes o acetato de etila, acetato de butila, 2-butanol, n-butanol e metil-isobutilcetona. Estas extrações foram feitas na temperatura ambiente, diferentes valores de pH (2,0; 3,0; 4,0 e 5,0) e em diferentes razões de volume entre as fases aquosa e orgânica (VFA/VFO). Após a extração com o solvente orgânico, a solução foi re-extraída com uma solução tampão fosfato. Também foram realizadas extrações com sistemas de duas fases aquosas (SDFA) formadas por polietileno glicol (PEG) e fosfato. As condições experimentais foram: temperatura ambiente; pH de 6,0 e 7,0; e diferentes pesos moleculares de PEG (400, 600, 4000). Para as extrações realizadas com solventes orgânicos, foi avaliada a purificação do ácido clavulânico através de adsorção por troca iônica com a resina Amberlite IRA-400 em coluna de leito fixo, na temperatura de 10°C e pH 6,2. Após a adsorção por troca iônica a coluna foi lavada com água milli Q, sendo que a eluição foi estudada com diferentes composições da solução constando de NaCl 5% (p/v) e tris - HCl. A eluição foi realizada a pH 6,2 e vazão de alimentação em torno de 6 mL.min<sup>-1</sup>. A solução eluída da troca iônica foi alimentada em uma coluna recheada com a resina Amberlite XAD-4, na temperatura de 10°C e pH de 6,2. Para as extrações com SDFA avaliou-se separadamente a aplicação da troca iônica e da adsorção não específica com a resina Amberlite XAD-4, para a separação do AC do PEG.

## ABSTRACT

A study was made of the extraction of clavulanic acid (CA) from a fermented medium and its concentration and purification, based on a comparison of two liquid-liquid extraction methods, followed by adsorption in a fixed bed column containing resins (hydrophobic polymeric resin and ion exchange resin). The extraction and adsorption steps proposed here were evaluated from the standpoint of Yield (Y), purification factor (PF) and concentration factor (CF). The extractions were carried out with the organic solvents ethyl acetate, butyl acetate, 2-butanol, n-butanol and methyl isobutyl ketone. These extractions were carried out at ambient temperature, pH values of 2.0, 3.0, 4.0 and 5.0 and with different volume ratios of aqueous phase and organic phase ( $V_{AF}/V_{OP}$ ). After extraction with the organic solvent, the solution was reextracted with a phosphate buffer solution. Extractions were also done with two-phase aqueous systems (TPAS) composed of polyethylene glycol (PEG) and phosphate. The experimental conditions were: ambient temperature, pH of 6.0 and 7.0, and different molecular weights of PEG (400, 600, 4000). For the extractions involving organic solvents, an evaluation was made of the purification of clavulanic acid by ion exchange adsorption with Amberlite IRA-400 resin in a fixed bed column at a temperature of 10°C and pH 6.2. After adsorption by ion exchange, the column was washed with Milli-Q water and the elution was studied with different compositions of a solution composed of NaCl 5% (p/v) and Tris-HCl. The elution was carried out at pH 6.2 and a feed flow of approximately 6 mL.min<sup>-1</sup>. The solution eluted from the ion exchange was fed into a column filled with Amberlite XAD-4 resin at a temperature of 10°C and pH of 6.2. For the TPAS extractions, the application of ion exchange and nonspecific adsorption with Amberlite XAD-4 resin for the separation of CA from PEG was evaluated separately.

# SUMÁRIO

DEDICATÓRIA.....	iii
AGRADECIMENTOS .....	iv
RESUMO .....	v
ABSTRACT .....	vi
SUMÁRIO.....	vii
LISTA DE FIGURAS .....	x
LISTA DE TABELAS .....	xi
NOMENCLATURA.....	xiii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	3
2.1 Antibióticos .....	3
2.2 Ácido clavulânico .....	4
2.3 Separação e purificação de bioprodutos .....	6
2.3.1 Separação de materiais insolúveis .....	6
2.3.2. Isolamento e concentração.....	6
2.3.3. Purificação primaria .....	6
2.3.4. Purificação final.....	6
2.4 Processos de separação e purificação de bioprodutos .....	9
2.4.1 Métodos cromatográficos .....	9
2.4.2 Extração Líquido – Líquido.....	12
2.5 Separação e Purificação de Substâncias de Baixa Massa Molecular .....	16
2.5.1 Vitaminas.....	16
2.5.2 Ácidos orgânicos .....	17
2.5.3 Antibióticos .....	18
3. MATERIAS E MÉTODOS .....	26
3.1 Materiais .....	26
3.1.1 Microrganismo .....	26
3.1.2 Resina .....	26
3.2 Equipamentos .....	26

3.2.1 Cromatógrafo líquido de alta eficiência .....	26
3.2.2 Coluna de leito fixo .....	26
3.2.3 Banho termostatizado .....	27
3.2.4 Centrífuga refrigerada.....	27
3.2.5 Ultrafreezer .....	27
3.2.6 Espectrofotômetro .....	27
3.2.7 Outros equipamentos .....	27
3.3 Métodos .....	27
3.3.1 Obtenção de soluções de ácido clavulânico .....	27
3.3.2 Tratamento do caldo fermentado .....	28
3.3.3 Análise da concentração de ácido clavulânico .....	28
3.3.4 Análise da concentração de contaminantes .....	29
3.3.5 Preparo das soluções estoque de PEG e tampão fosfato .....	29
3.3.6 Determinação do coeficiente de partição para os solventes orgânicos.....	30
4. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL .....	32
4.1 Extração de solvente orgânico .....	32
4.2 Determinação do coeficiente de partição ( $K_p$ ) para os solventes orgânicos .....	32
4.3 Extração em sistemas de duas fases aquosas.....	32
4.4 Adsorção em coluna de leito fixo .....	33
4.5 Modelo de um extrator contra - corrente .....	34
4.5.1 Modelo considerando-se a degradação do ácido clavulânico na fase aquosa ....	36
4.5.2 Sem degradação do ácido clavulânico fase aquosa .....	37
5. RESULTADOS .....	38
5.1 Determinação do coeficiente de partição ( $K_p$ ) para extração por solvente orgânico	38
5.2 Extração do ácido clavulânico com acetato de etila .....	42
5.2.1 Influência do pH .....	42
5.2.2 Influência dos volumes .....	43
5.2.3 Extração do ácido clavulânico com acetato de etila seguida de adsorção em coluna de leito fixo .....	44
5.3 Extração do ácido clavulânico por n-butanol seguida de adsorção em coluna de leito fixo.....	49
5.4 Extração do ácido clavulânico em sistemas de duas fases aquosas seguida de adsorção em coluna de leito fixo .....	51
5.5 Comparação de dois métodos de extração líquido-líquido.....	55

5.6 Simulação de um extrator contra-corrente .....	57
6. CONCLUSÕES .....	61
7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	62
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	63
APÊNDICE A .....	68
APÊNDICE B.....	72

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura química do ácido clavulânico (Reading & Cole, 1977). .....	4
Figura 2: Subprocessos de recuperação do produto extracelular (Asenjo, 1990). .....	7
Figura 3: Subprocessos de recuperação.....	8
Figura 4: Esquema do mecanismo de troca iônica, (Collins, 1995).....	10
Figura 5: Esquema de um trocador aniônico e catiônico.....	11
Figura 6: Exemplo genérico de um diagrama de fases (Albertsson, 1986).....	14
Figura 7: Esquema de separação do ácido clavulânico (Butterworth, 1984). .....	20
Figura 8: Esquema de reação do AC com imidazol (Eckers et al., 1996).....	28
Figura 9: Ilustração de um sistema experimental de extração por solvente, seguida da etapa de re-extração. ....	30
Figura 10: Esquema do aparato experimental utilizado nos ensaios de adsorção.....	33
Figura 11: Esquema de um extrator contra-corrente. ....	35
Figura 12: Ajuste da Equação 3.5 aos dados experimentais para a determinação do $K_p$ para o sistema ácido clavulânico e acetato de etila .....	39
Figura 13: Ajuste da Equação 3.5 aos dados experimentais para a determinação do $K_p$ para o sistema ácido clavulânico e n-butanol. ....	40
Figura 14: Comportamento da concentração de ácido clavulânico no ensaio E1, na etapa de purificação com a resina IRA-400.....	47
Figura 15: Comportamento da concentração de ácido clavulânico e contaminantes no ensaio E1, na etapa de purificação com a resina XAD-4. ....	47
Figura 16: Comportamento da concentração de ácido clavulânico e contaminantes, na etapa de purificação com a resina XAD-4. ....	54
Figura 17: Comportamento da concentração de ácido clavulânico e contaminantes, na etapa de purificação com a resina IRA-400. ....	54
Figura 18: Comportamento da concentração de ácido clavulânico e contaminantes, na etapa de purificação com a resina IRA-600. ....	55
Figura 19: Comparação do rendimento de AC simulados para os vários tempos de residência. ....	59
Figura 20: Comparação dos perfis de perdas de AC simulados.....	60

## LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1: Operações de purificação e separação das proteínas .....	8
Tabela 5.1: Resultados da extração do ácido clavulânico com o solvente orgânico acetato de etila. ....	39
Tabela 5.2: Resultados da extração do ácido clavulânico com o solvente orgânico n-butanol. ....	40
Tabela 5.3: Resultados obtidos do coeficiente de partição para os solventes: acetato de butila, 2-butanol e metil isobutil cetona. ....	41
Tabela 5.4: Valores do coeficiente de partição $K_p$ , obtidos e da constante dielétrica e polaridade para os solventes orgânicos utilizados tal como tabelados por West et al (1984) .....	41
Tabela 5.5: Resultados obtidos para a concentração de ácido clavulânico na 1º fase aquosa, nos diferentes pHs verificados.....	42
Tabela 5.6: Resultados obtidos para a concentração de ácido clavulânico na primeira e segunda fase aquosa e seus respectivos fatores de concentração, fatores de purificação e rendimento. ....	43
Tabela 5.7: Resultados obtidos de fator de concentração, fator de purificação e rendimento para a etapa de extração e as etapas de adsorção no ensaio E1. ....	45
Tabela 5.8: Resultados obtidos de fator de concentração, fator de purificação e rendimento para a etapa de extração e as etapas de adsorção, no ensaio E2. ....	46
Tabela 5.9: Resultados obtidos de fator de concentração, fator de purificação e rendimento para a etapa de extração e as etapas de adsorção, no ensaio E3. ....	48
Tabela 5.10: Resultados obtidos de fator de concentração, fator de purificação e rendimento para a etapa de extração e as etapas de adsorção no ensaio E4.....	48
Tabela 5.11: Resultados obtidos de fator de concentração e rendimento para as etapas de extração e adsorção no ensaio F1. ....	49
Tabela 5.12: Resultados obtidos de fator de concentração e rendimento para as etapas de extração e adsorção no ensaio F2. ....	50
Tabela 5.13: Resultados obtidos de fator de concentração, fator de purificação e rendimento para as etapas de extração e adsorção, no ensaio F3. ....	50
Tabela 5.14: Resultados obtidos de fator de concentração e rendimento para as etapas de extração e adsorção no ensaio F4. ....	51
Tabela 5.15: Composição dos sistemas para os PEG's 400, 600 e 4000 e pH 6 e 7.....	52

Tabela 5.16: Resultados obtidos para os sistemas (PEG-fosfato) estudados. ....	52
Tabela 5.17: Resultados obtidos de fator de concentração, fator de purificação e rendimento do ácido clavulânico. ....	56
Tabela 5.18: Resultados obtidos para a concentração final de ácido clavulânico na fase orgânica nos diferentes tempos de residência e concentração final de AC sem considerar a degradação. ....	58
Tabela 5.19: Resultados obtidos para as perdas de AC (diferentes tempos de residência). ....	59
Tabela Apêndice B: Resultados obtidos para a concentração final de ácido clavulânico na fase aquosa nos diferentes tempos de residência e concentração final de AC sem considerar a degradação. ....	72

## NOMENCLATURA

AC	Ácido clavulânico
C	Concentração de AC (mg/L)
C <sub>0</sub>	Concentração inicial (mg/L)
C <sub>t</sub>	Contaminantes final
C <sub>t0</sub>	Contaminantes inicial
E	Resultado do espectrofotômetro
FC	Fator de concentração
FP	Fator de purificação
FA	Vazão mássica
m <sub>0</sub>	Massa inicial (mg)
m <sub>f</sub>	Massa final (mg).
R	Rendimento
P	Perdas
V	Volume do extrator
t	Tempo (minuto)
V <sub>0</sub>	Volume inicial (mL)
V <sub>f</sub>	Volume final (mL)
VZ	Vazão volumétrica (mL/min)
Y	Correção da medida realizada no HPLC para a medida do espectrofotômetro
Kd	Constante de degradação do AC (h <sup>-1</sup> )

# 1. INTRODUÇÃO

O ácido clavulânico (AC) é um potente inibidor de  $\beta$ -lactamases, usado com penicilinas dando a elas proteção contra estas, enzimas que são produzidas pelas bactérias resistentes a antibióticos  $\beta$ -lactâmicos. O ácido clavulânico é produzido pelo microorganismo *Streptomyces clavuligerus*, e purificado a partir de caldos fermentados, onde a purificação consiste primeiramente na separação de insolúveis, utilizando os processos de filtração, microfiltração e centrifugação, seguida de uma concentração através de uma extração líquido-líquido e por fim a concentração e cristalização do antibiótico (Nabais e Cardoso, 1994).

Porém uma das grandes limitações das técnicas envolvidas está na aplicação em escala industrial, pois esta envolve grandes volumes de operação e a capacidade de recuperação é relativamente baixa. Assim, a escolha de um processo viável e dos reagentes a serem utilizados, levando-se em conta a sua reutilização, são fatores determinantes para implementação de um processo de purificação que vise baixar o custo de produção (Almeida, 2003).

Tendo em vista a grande importância dos antibióticos beta-lactâmicos e por sua vez do ácido clavulânico tanto no aspecto terapêutico quanto econômico, vários trabalhos na Área de Pesquisa da Engenharia Bioquímica do DEQ/UFSCar vêm sendo desenvolvidos visando sua produção, separação e purificação em processos convencionais e não convencionais.

Visando contribuir com os estudos de separação e purificação propôs-se esta dissertação de mestrado, cujo objetivo geral foi investigar a extração líquido-líquido do ácido clavulânico como uma etapa de concentração e possível purificação, seguindo-se de uma etapa específica de purificação por adsorção de troca iônica e adsorção não específica.

Para que este objetivo geral fosse satisfeito os seguintes objetivos específicos foram propostos:

- Para as extrações líquido-líquido: determinar o coeficiente de partição do ácido clavulânico em solventes orgânicos e naqueles formados por sistemas de duas fases aquosas (SDFA) compostos por polietileno glicol (PEG) e fosfato;

- Estudar a re-extração do AC dos solventes orgânicos e avaliar a possibilidade de re-extração do AC extraído do PEG, através da utilização da troca iônica e da adsorção;
- Para a troca iônica: avaliar o fator de concentração e o fator de purificação em diferentes condições de eluição na coluna de troca iônica.

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1 Antibióticos**

Segundo o conceito original de Waksman apud (Oselka et al.,1978), estabelecido em 1942, dava-se o nome de antibióticos às substâncias elaboradas por seres vivos (geralmente microscópicos) dotados de atividade antimicrobiana, atuando como tóxicos seletivos, em pequenas concentrações. Porém com a síntese em laboratório de antigos antibióticos, a criação de métodos catalíticos para maior rendimento dos processos fermentativos e, entre outros fatores, a obtenção do núcleo ativo de alguns antibióticos, particularmente das penicilinas e cefalosporinas, exigiram modificações no conceito de Waksman e a introdução de nova terminologia. Assim, atualmente, se designa por antibiótico toda a substância originalmente obtida na natureza a partir de microrganismos (fungos, actinomicetos ou bactérias) ou extraída de vegetais, capaz de atuar em pequenas concentrações contra agentes infecciosos e/ou útil no tratamento de algumas neoplasias (Oselka et al,1978).

O mais famoso exemplo é a inibição de crescimento que foi observado por Alexander Fleming 1928 (publicada em 1929), quando o crescimento de *Staphylococcus* em placa de Petri foi inibido por uma cultura contaminante, o fungo *Penicillium notatum*. O contaminante *Penicillium* produziu a penicilina, um antibiótico. A penicilina foi o primeiro antibiótico a ser produzido industrialmente e, muito do que se aprendeu na transferência das observações laboratoriais de Fleming para uma operação em larga escala, economicamente viável, pavimentou o caminho para a produção de outros agentes quimioterápicos, à medida que foram descobertos (Crueger, 1984).

Aproximadamente 6000 dessas substâncias são conhecidas, e no mínimo 91 são produzidas comercialmente por fermentação. Outros 46 antibióticos semi-sintéticos têm aplicações clínicas. Cloranfenicol e pirrolnitrina foram originalmente descobertos como compostos microbianos, mas agora são produzidos quimicamente “in vitro”. Os antibióticos são produzidos por bactérias e fungos. Apenas 10 dos antibióticos conhecidos e produzidos comercialmente são provenientes de fungos.

Dentre os mesmos, somente as penicilinas, cefalosporinas, griseofulvina e ácido fusídico são clinicamente importantes. Nas bactérias, existem alguns grupos taxonômicos importantes que produzem antibióticos. A grande variedade quanto à estrutura e número de antibióticos é encontrado nos actinomicetos, especialmente no gênero *Streptomyces*. Outro importante grupo de substâncias é o dos antibióticos polipeptídicos produzidos pelas bactérias do gênero *Bacillus* (Crueger, 1984).

## 2.2 Ácido clavulânico

O ácido clavulânico é uma substância de ocorrência natural detectada pela primeira vez em culturas de *Streptomyces clavuligerus*, por pesquisadores do Beecham Laboratories na Inglaterra (Brown et al., 1976) apud (Butterworth, 1984). Foi isolado e teve sua estrutura elucidada por (Howarth et al, 1976). É uma substância  $\beta$ -lactâmica formada pelos anéis: o anel  $\beta$ -lactâmico e o anel oxazolidino condensados. Diferentemente das penicilinas e cefalosporinas, possui um átomo de oxigênio no lugar de um átomo de enxofre (Howarth et al.,1976) apud (Butterworth, 1984). Sua estrutura química pode ser observada através da Figura 1.

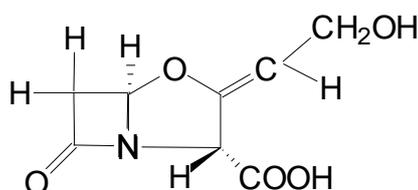


Figura 1: Estrutura química do ácido clavulânico (Reading & Cole, 1977).

O ácido clavulânico, produto do metabolismo secundário de alguns actinomicetos, é conhecido como um potente inibidor de  $\beta$ -lactamases, enzimas que clivam o anel  $\beta$ -lactâmico de penicilinas e cefalosporinas, fazendo com que estes compostos percam as suas atividades antibacterianas (Reading e Cole, 1977). Membros do gênero bacteriológico *Streptomyces* caracterizam-se pela grande capacidade de produzir uma variedade de metabólitos secundários, dentre os quais os compostos  $\beta$ -lactâmicos. Os antibióticos  $\beta$ -lactâmicos compõem um dos grupos

de fármacos mais importantes, nos aspectos terapêutico e comercial. Aproximadamente 60% do mercado mundial de antibiótico é relativo a comercialização destes compostos (Mayer et al., 1996).

Esta inibição é específica e irreversível tendo o ácido clavulânico sido, por causa disso, apelidado de “antibiótico suicida”. Assim, com a sua descoberta, abre-se a possibilidade de sua utilização associado às penicilinas sensíveis as  $\beta$ -lactamases que assim poderão atuar. Graças à inativação enzimática, a penicilina G e a ampicilina (e seus análogos e derivados) terão seus espectros ampliado, passando a atuar contra cepas anteriormente resistentes de *Staphylococcus*, *Klebsiella*, *Proteus* e *E. Coli* (Fonseca, 1984).

A combinação do ácido clavulânico com penicilinas e cefalosporinas, entre outros, tem potencializado a atividade antibacteriana de tais compostos. A associação deste a uma penicilina semi-sintética denominada amoxicilina, é o exemplo mais relevante de utilização comercial de antibióticos sensíveis à  $\beta$ -lactamases juntamente com substâncias inibidoras dessas enzimas. No Brasil, o medicamento CLAVULIN®, comercializado pela SMITHKLINE BEECHAM Farmacêutica, é um exemplo deste tipo de associação (Mayer e Deckwer, 1996).

O ácido clavulânico é produzido por via fermentativa por várias espécies de *Streptomyces* entre elas o *Streptomyces clavuligerus*, bactéria filamentosa estritamente aeróbia, produtora de vários tipos de antibióticos como desacetoxicefalosporina C, penicilina N e cefamicina C, entre outros (Reading e Cole, 1977).

O ácido clavulânico não possui nenhum grupo fortemente hidrofóbico e apresenta velocidades de degradação elevadas em regiões básicas ( $\text{pH} > 7,5$ ) e ácidas ( $\text{pH} < 4,5$ ) (Bersanetti et al., 2005). Isso leva a rendimentos de recuperação considerados baixos, durante os processos de purificação e principalmente de extração, quando comparados a outros compostos  $\beta$ -lactâmicos (Mayer et al, 1997).

## **2.3 Separação e purificação de bioprodutos**

Conforme citado por Blanch (1997) os processos de bioseparação são divididos em quatro etapas:

### **2.3.1 Separação de materiais insolúveis**

Materiais insolúveis incluindo células intactas, restos de células, partículas de proteínas agregadas e nutrientes não dissolvidos. Nesta etapa as operações utilizadas são sedimentação, centrifugação e filtração.

### **2.3.2. Isolamento e concentração**

Geralmente se refere ao isolamento do produto desejado das impurezas. A concentração vai ocorrer em todas as etapas do processo, mas é nesta etapa onde ocorre uma concentração significativa do produto desejado. Nesta categoria inclui extração, ultrafiltração, precipitação e troca iônica.

### **2.3.3. Purificação primária**

É mais seletiva que o processo de isolamento, algumas etapas da purificação pode separar compostos que tenham propriedades químicas e físicas muito similares. Técnicas da purificação primária incluem cromatografia e precipitação fracionada.

### **2.3.4. Purificação final**

Muitos bioprodutos requerem uma alta pureza, como por exemplo, os produtos farmacêuticos e terapêuticos. Após a purificação primária o produto está quase puro. Cristalização e/ou secagem são utilizadas para atingir a pureza final.

Cada tipo de célula pode conter milhares de proteínas, pois cada espécie de organismo contém um conjunto distinto de proteínas. O isolamento na forma pura de uma determinada proteína é realizado por diferentes métodos, sendo que não existe um método único ou um conjunto

de métodos aplicáveis ao isolamento de todas as proteínas indistintamente. Porém, para qualquer proteína é possível, geralmente, escolher uma seqüência de etapas de separação que irão resultar em um grau elevado de purificação e um alto rendimento.

O objetivo geral é aumentar a pureza ou a afinidade biológica da proteína desejada por unidade de massa, pela eliminação das proteínas inativas ou indesejáveis, enquanto, ao mesmo tempo, eleva-se o rendimento ao máximo. Ainda dependendo do organismo, a proteína pode ser intracelular ou extracelular. No caso em que a proteína é extracelular, trabalha-se com o caldo líquido. As operações unitárias são mostradas na Figura 2.

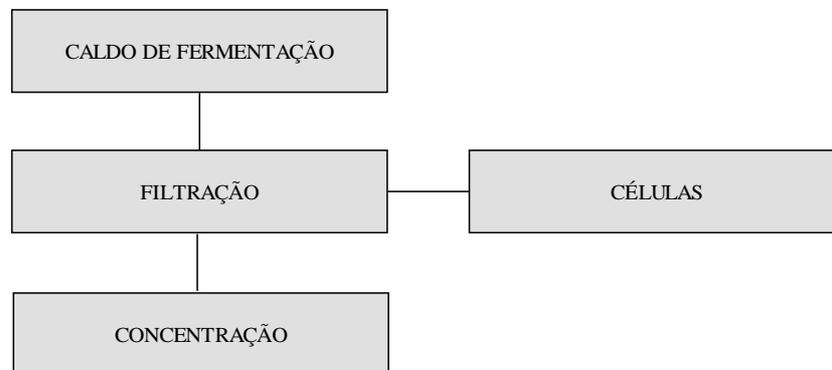


Figura 2: Subprocessos de recuperação do produto extracelular (Asenjo, 1990).

Para proteínas intracelulares, a fração sólida que é conservada, tornando o processo mais complexo. A Figura 3 mostra a separação de proteínas recombinantes intracelulares, que é o caso mais complexo.

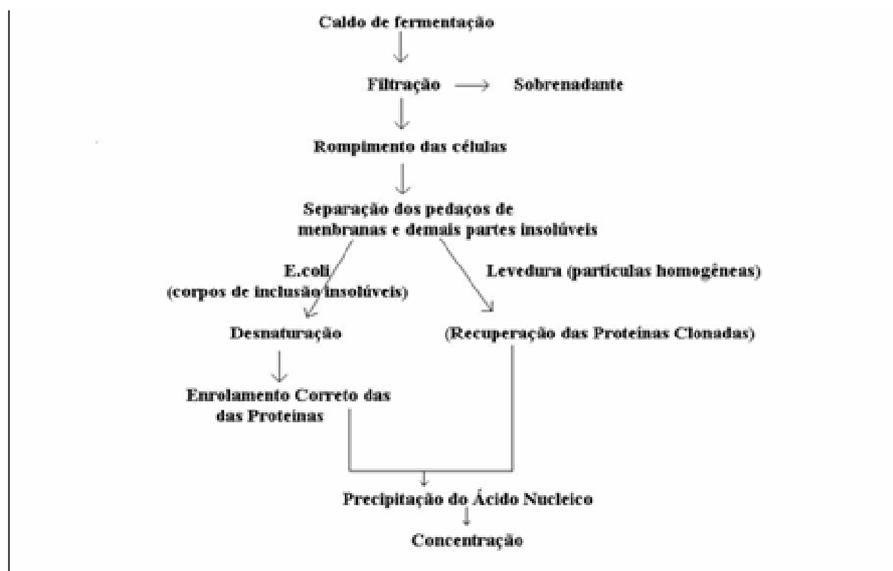


Figura 3: Subprocessos de recuperação

A Tabela 2.1 mostra as principais etapas de separação e purificação de proteínas, conforme suas propriedades, Asenjo (1990).

Tabela 2.1: Operações de purificação e separação das proteínas

Operações	Propriedades
Centrifugação	Velocidade
Filtração	Tamanho da partícula
Microfiltração	Tamanho da partícula
Homogeneização	Natureza intracelular
Moinho de bolas	Natureza intracelular
Ultrafiltração	Tamanho molecular
Extração em duas fases	Coefficiente de partição
Precipitação	Solubilidade
Adsorção	Forças de Van der Waals, polaridades
Troca iônica	Carga
Interações hidrofóbicas	Superfície hidrofóbica
Afinidade cromatográfica	Afinidade biológica
Filtração em gel	Tamanho molecular
Cromatografia líquida de fase reversa	Interações hidrofóbicas e hidrofílicas

## **2.4 Processos de separação e purificação de bioprodutos**

### **2.4.1 Métodos cromatográficos**

A cromatografia é um método físico-químico de separação. É fundamentada na migração diferenciada dos componentes de uma mistura, que ocorre devido a diferentes interações entre a fase móvel (eluente) e a fase estacionária (material de empacotamento).

É uma técnica versátil e de grande aplicação devido à grande variedade de combinações entre fases móveis e estacionárias (Cass et. al, 2001).

A cromatografia é uma técnica de separação de multicomponentes baseada na migração diferencial como resultado da adsorção ou partição de solutos em uma fase estacionária. As técnicas de cromatografia líquida podem ser classificadas em:

- Distribuição: utiliza a solubilidade diferencial de uma substância em duas fases líquidas imiscíveis;
- Adsorção: é baseado em adsorção não específica das moléculas alvo em um suporte sólido;
- Troca iônica: separa moléculas baseadas no seu tamanho, seu peso molecular e carga;
- Cromatografia de afinidade: depende da adsorção bioespecífica das moléculas alvo em uma fase apropriada (Collins, 1995).

#### **2.4.1.1 Cromatografia por troca iônica**

##### **A) Mecanismo de atuação**

No mecanismo de atuação da cromatografia por troca iônica a fase estacionária é altamente carregada, sendo que solutos com cargas de sinais contrários a esta são seletivamente adsorvidos da fase móvel. Os solutos adsorvidos podem ser subsequentelemente eluídos, por deslocamento com outros íons, com o mesmo tipo de carga, porém com maior força de interação com a fase estacionária, como pode ser observado na Figura 4 (Collins, 1995).

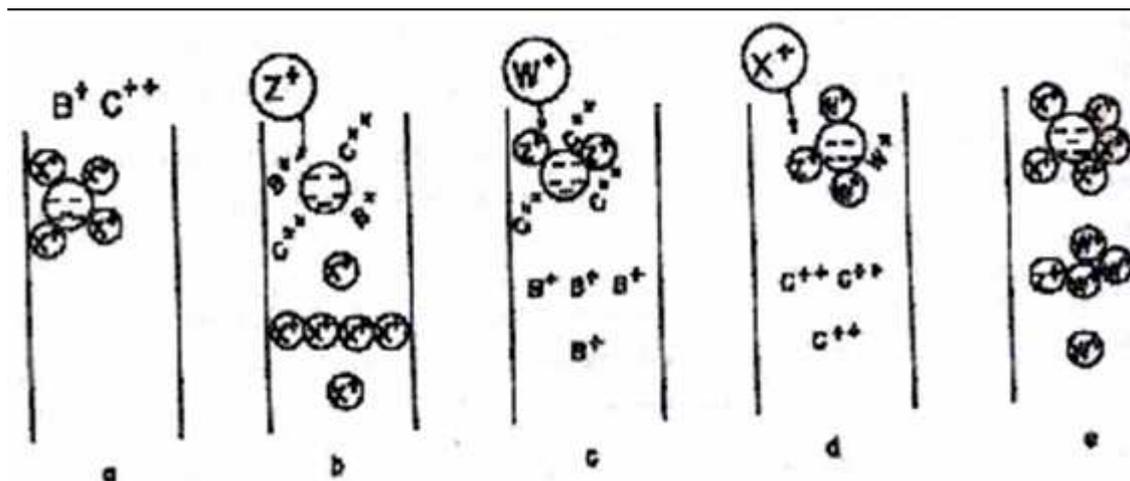


Figura 4: Esquema do mecanismo de troca iônica, (Collins, 1995).

Os diferentes graus de afinidade eletrostática entre o trocador e os íons da fase móvel regem este tipo de cromatografia. A separação de materiais por cromatografia por troca iônica está baseada na interação reversível e diferencial dos íons da fase móvel pelo trocador da matriz. A diferença de afinidade entre os íons da fase móvel e matriz é devido à diferença de carga, sendo possível controlá-la através do pH e força iônica do meio. Para que a coluna possa ser novamente utilizada ela precisa ser regenerada, isto é, ser equilibrada com o eluente inicial.

## B) A matriz

A matriz de um trocador de íons é constituída de um material poroso (natural ou sintético), inerte, insolúvel em água e em solventes orgânicos, apresentando ligações covalentes a grupos trocadores iônicos. Dependendo do grupo trocador ligado covalentemente à matriz, os trocadores iônicos são classificados em aniônicos e catiônicos (Collins, 1995).

Os trocadores aniônicos, como o próprio nome indica, trocam ânions e apresentam, portanto, grupos iônicos positivos ligados à matriz. Os trocadores catiônicos, inversamente, trocam cátions e apresentam grupos iônicos negativos ligados à matriz, como pode ser observado na Figura 5.

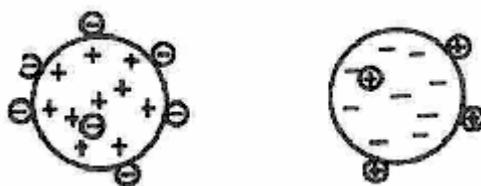


Figura 5: Esquema de um trocador aniônico e catiônico.

Existem fatores que influenciam a escolha da fase móvel e são os seguintes:

- Escolha do trocador iônico: A escolha de um trocador iônico deve ser orientada em função da finalidade a que se destina. A porosidade de um trocador iônico não altera o mecanismo de ligação dos íons presentes na fase móvel, mas influencia na sua capacidade, pois impede o acesso de moléculas maiores a grupos trocadores nos poros interiores da matriz.
- Seleção da fase móvel: A fase móvel pode ser constituída por soluções ácidas, básicas ou ainda por soluções tampões. Nestas, podem ser adicionados sais neutros ou solventes orgânicos, com a finalidade de se aumentar a seletividade para determinado propósito. Quando uma fase móvel é uma solução tampão, sua escolha é função do valor em que se pretende manter o pH. A faixa de boa capacidade tamponante está ao redor do pKa ( $\pm 1$ ) do ácido conjugado empregado no preparo do tampão. Na literatura encontram-se vários tampões utilizados em cromatografia por troca iônica, sendo os mais comuns o fosfato, o borato, Tris, o citrato e o acetato. A concentração dos tampões geralmente utilizados está na faixa de  $1 \times 10^{-3}$  a  $5 \times 10^{-1} \text{M}$  (Collins, 1995).

### C) Eluição em cromatografia por troca iônica

A eluição da coluna cromatográfica pode ser feita usando o próprio tampão utilizado no preparo da coluna. Neste caso, a cromatografia é chamada de equilíbrio. Em geral, este tipo de cromatografia leva à separação mais lenta dos componentes do que aquela em que há troca de tampões, mas, às vezes, deve-se recorrer a este tipo de cromatografia para separar dois

componentes que apresentam cargas semelhantes. Outra possibilidade de eluição de uma coluna cromatográfica é por mudanças de fases discretas de pH ou de força iônica, ou ainda, de uma combinação destes fatores.

A mudança de pH do tampão eluente em direção ao ponto isoelétrico de uma das substâncias-amostra causa a diminuição da carga-líquida, sendo mais facilmente eluída do trocador. A força iônica pode ser variada para se obter a eluição mais lenta ou eluição mais rápida de substâncias. Diminuindo-se a força iônica a competição pelos grupos carregados do trocador é mínima e as substâncias são ligadas fortemente a ele. Aumentando-se a força iônica aumenta-se a competição e reduz-se a interação entre o grupo trocador e as substâncias-amostra, que são assim eluídas (Collins, 1995).

## **2.4.2 Extração Líquido – Líquido.**

### **2.4.2.1 Extração por solvente orgânico**

A extração por solvente orgânico é uma técnica em que uma solução (usualmente aquosa) é posta em contato com um segundo solvente (usualmente orgânico), essencialmente imiscível com o primeiro solvente, a fim de provocar uma transferência de um, ou de mais de um, soluto para o segundo solvente. Em particular, a extração por solvente pode ser usada para conseguir uma “purificação” e para concentrar os solutos de interesse. A eficiência obtida está relacionada ao coeficiente de partição ( $K_p$ ) referente à extração realizada, definido como sendo a relação entre as concentrações de soluto nas fases orgânica e aquosa (Vogel, 1992).

### **2.4.2.2 Extração em duas fases aquosas**

A extração líquido-líquido, tradicionalmente empregada em engenharia química, utiliza diversos tipos de solventes que muitas vezes podem influenciar na estabilidade das biomoléculas, levando até a sua desnaturação. Por isso, no caso da separação e purificação de biomoléculas, novos tipos de extração líquido-líquido vêm sendo estudados (Minami, 1997; Kilikian et al., 2000 apud Hirata, 2003).

Albertsson (1986), em meados dos anos 50, na Suécia, demonstrou que materiais biológicos (de proteínas a células) poderiam ser separados por sistemas de duas fases aquosas (SDFAs). Dentre as vantagens desta técnica destaca-se: facilidade e confiabilidade de se reproduzir, em escalas maiores, os resultados obtidos em escala de laboratório; possibilidade de atingir o transporte de massa e o equilíbrio das fases utilizando pouca energia; possibilitando desenvolver um processo contínuo de extração; separação seletiva e rápida; realizar a extração em temperaturas ambientes; economia do processo em relação aos processos convencionais, como a cromatografia.

O primeiro a relatar o aparecimento de duas fases aquosas foi Bijerinck, um microbiologista holandês em 1896 apud (Albertsson, 1986), ao tentar misturar sem sucesso, soluções aquosas de gelatina e ágar e de gelatina e amido solúvel. A mistura tornava-se turva e separava-se em duas fases líquidas, sendo a fase inferior rica em ágar ou amido e a superior, rica em gelatina. A formação de um sistema de duas fases aquosas ocorre ao se misturarem duas soluções imiscíveis. Essas soluções podem ser duas soluções poliméricas ou uma solução polimérica e um polieletrólito de alto peso molecular, ou ainda, uma solução polimérica e outra salina. Os sistemas de duas fases aquosas mais utilizados e relatados na literatura, são PEG-sal (fosfato, citrato ou sulfato) e PEG-dextrana, devido a uma série de vantagens quando comparados a outros sistemas, como baixo custo de seus componentes, atoxidade, grande faixa de aplicação e curto tempo para a separação das fases.

- Diagrama de Fases

A formação das duas fases aquosas depende da concentração dos componentes do sistema. Em uma mistura PEG, fosfato e água, a formação de um sistema de duas fases aquosas ocorrerá somente quando os constituintes presentes estiverem em uma certa faixa de proporções, (Asenjo,1990).

O diagrama de fases mostra uma região monofásica e uma bifásica de acordo com a concentração de cada componente, expressa em % p/p. A concentração é expressa em % p/p devido

à alta viscosidade das soluções poliméricas, que poderia causar erros caso as concentrações fossem expressas em volumes.

A Figura 6 mostra um exemplo de um diagrama de fases genérico. A curva que separa a região de duas fases da região de uma fase é chamada de curva binodal ou curva de equilíbrio. Todas as composições formadas acima da curva binodal dão origem a duas fases, e as composições abaixo da curva binodal dão origem a uma fase homogênea.

A composição inicial do sistema é dada pelo ponto E e a composição final de cada fase, após atingir o equilíbrio é dada pelos pontos F (fase superior ou de topo) e G (fase inferior ou de fundo). Da mesma maneira, um sistema cuja composição inicial é dada por E' terá como composição final de cada fase após atingir o equilíbrio os pontos F' (fase superior ou de topo) e G' (fase inferior ou de fundo).

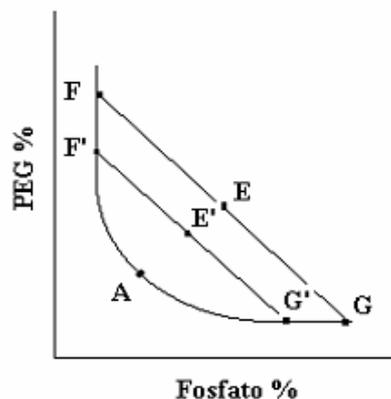


Figura 6: Exemplo genérico de um diagrama de fases (Albertsson, 1986).

O segmento FEG é chamado de tie-line ou linha de amarração, e todos os sistemas cuja composição inicial está contida nessa linha possuem a mesma composição de fases após o equilíbrio, porém com diferentes razões de volumes entre as fases superiores e inferiores. Os pares de pontos F e G são chamados de pontos de nó. O segmento FE é proporcional ao volume da fase inferior e o segmento GE ao da fase superior. Isso pode ser explicado pelo balanço de massa de um dos componentes, por exemplo o PEG. Chamando de  $m_t$  a massa de PEG na fase superior,  $m_f$  a

massa de PEG na fase inferior e  $m_i$  a massa total de PEG que foi adicionada inicialmente no sistema, pode-se dizer que:

$$m_t + m_f = m_i \quad (1)$$

Pode-se afirmar que:

$$100m_t = V_{\text{topo}} d_t C_t \quad (2)$$

$$100m_f = V_{\text{fundo}} d_f C_f \quad (3)$$

$$100m_i = (V_{\text{topo}} d_t + V_{\text{fundo}} d_f) C_i \quad (4)$$

Onde :  $V_{\text{topo}}$  é o volume da fase de topo

$V_{\text{fundo}}$  é o volume da fase inferior

$d_t$  é a densidade da fase de topo

$d_f$  é a densidade da fase de fundo

$C_t$  é a concentração do PEG na fase de topo em %p/p

$C_f$  é a concentração do PEG na fase de fundo em %p/p

$C_i$  é a concentração total do PEG no sistema em %p/p

Substituindo-se (2), (3) e (4) em (1) tem-se a Equação 2.1:

$$(V_{\text{topo}} d_t)/(V_{\text{fundo}} d_f) = (C_f - C_i)/(C_i - C_t) \quad (2.1)$$

Do diagrama de fase tem-se a Equação 2.2:

$$(C_f - C_i)/(C_i - C_t) = (EG/EF) \quad (2.2)$$

Substituindo tem-se a Equação 2.3:

$$(V_{\text{topo}} d_t)/(V_{\text{fundo}} d_f) = (EG/EF)$$

$$(V_{\text{topo}}/V_{\text{fundo}}) = (d_f EG)/(d_t EF) \quad (2.3)$$

Como as densidades das fases estão na faixa de 1 a 1,1g.cm<sup>-3</sup> e portanto próximas à densidade da água, pode-se afirmar que EG é proporcional ao volume da fase superior e EF ao da fase inferior.

O ponto A na Figura 6 é chamado de ponto crítico e a composição representada por ele é chamada de composição crítica. No ponto crítico as composições e os volumes das duas fases são iguais. Não se recomenda trabalhar com sistemas muito próximos ao ponto crítico devido à instabilidade nesse ponto, pois uma pequena mudança na composição do sistema, faz com que o sistema passe da região bifásica para a região monofásica. Por isso os sistemas próximos ao ponto crítico devem ser evitados (Albertsson, 1986).

## **2.5 Separação e Purificação de Substâncias de Baixa Massa Molecular**

### **2.5.1 Vitaminas**

#### **2.5.1.1 Riboflavina ou Vitamina B2**

Florent (1986) relata o método utilizado para recuperar a vitamina B2 após a fermentação. As variações do método dependerão da finalidade de utilização do produto: para alimentação animal ou uso farmacêutico. Para alimentação animal, após ajustar o pH em 4,5, o caldo é simplesmente concentrado e seco. A concentração leva de 3-4 horas, muitas vitaminas podem ser obtidas por procedimentos descritos por Merck (1979) apud (Florent, 1986).

Isto envolve tratar o caldo à 60°C por 3 horas com a protease alcalina bacteriana; após, é resfriado até 25°C e ajustado o pH em 7; a mistura é centrifugada e a parte insolúvel é recuperada e lavada com água e seca.

Para preparar a vitamina purificada para uso humano (farmacêutico), é ajustado o pH do caldo em 4,5 e aquecida até 121°C por 1 hora para dissolver a riboflavina. Depois é centrifugada para separar a parte insolúvel, a solução então é tratada com um agente redutor.

A riboflavina reduzida tem menor solubilidade do que a forma oxidada, precipitando. Ela é então reoxidada com ar e dissolvida com 10% de ácido clorídrico a 60°C. Em seguida resfriando e neutralizando, a riboflavina cristaliza (Kyowa, 1977) apud (Florent, 1986). Muitos métodos de extração, baseados em diferença de solubilidade da riboflavina das formas reduzida e oxidada, são descritas em patentes por (Hanson, 1967 e Perlman, 1979) apud (Florent, 1986).

### **2.5.1.2 Vitamina A ( $\beta$ -Caroteno)**

Os carotenóides são sintetizados durante a fermentação. A quantidade produzida pode atingir de 30-35 mg por g de micélio seco. O micélio pode ser utilizado diretamente para alimentação animal após ser filtrado, lavado e seco em baixas temperaturas e pressões. Mas para assegurar uma boa estabilidade do  $\beta$ -caroteno, é adicionada uma pequena quantidade de antioxidante, sendo depois seco.

Para separar os carotenóides do caldo, o mesmo é filtrado. Os carotenóides contêm aproximadamente 75-90% de  $\beta$ -caroteno, que são extraídos com solvente orgânico (cloro de metila, hexano). Uma série de precipitações, dissoluções e cristalizações, assim como uma variedade de extrações com solventes ou mistura de solventes, são executadas para obter o  $\beta$ -caroteno puro (Florent, 1986).

## **2.5.2 Ácidos orgânicos**

### **2.5.2.1 Ácido Láctico**

O ácido láctico é recuperado a partir do caldo fermentado, mas requer algumas considerações devidas sua natureza corrosiva. Geralmente são utilizados vasos de aço inox. Para controlar o pH é utilizada cal, mas primeiro o caldo é aquecido até (80-100°C) para a desinfecção do meio e solubilizar o lactato de cálcio. O caldo é filtrado e tratado com carvão ativado para remover as impurezas coloridas. O lactato de cálcio é evaporado até chegar a uma concentração de 37% a 70°C e acidificado com ácido sulfúrico. O sulfato de cálcio é precipitado e removido por filtração e a solução de ácido láctico é tratada com carvão ativado e evaporada até uma concentração de 50 a 80% , dependendo de sua finalidade. Outros métodos de separação podem ser utilizados como: a extração líquido-líquido e uma re-extração com bases aquosas ou eletrodíálises com soluções de amônia são utilizadas para controlar o pH (Blanch, 1997).

### **2.5.2.2 Ácido Cítrico**

O meio filtrado deverá ser submetido a outra filtração, caso esteja turvo devido à presença de resíduos de anti-espumante, de micélio ou de oxalato. O citrato é precipitado da solução por adição de suspensão de hidróxido de cálcio (que deverá ter um teor baixo de magnésio para não haver formação de citrato de magnésio, que é solúvel em água). Em seguida, o citrato de cálcio é filtrado e a massa transferida para um tanque, onde ela vai ser tratada com ácido sulfúrico para precipitar o sulfato de cálcio.

O sobrenadante contendo o ácido cítrico é purificado por tratamento com carvão ativado e desmineralizado por sucessivas passagens através de colunas com resina de troca iônica e a solução purificada é então cristalizada por evaporação, sendo os cristais removidos por centrifugação. Pode ser necessária uma recristalização para atender os padrões USP (United States Pharmacopoeia). Há um processo de separação (patenteado pelas usinas de Melle) em que o ácido cítrico é extraído por filtração do caldo fermentado, com uso de solventes orgânicos, sendo depois descolorido e precipitado (Lima, 2001).

### **2.5.3 Antibióticos**

#### **2.5.3.1 Penicilina**

Conforme (Swartz, 1985) a penicilina é considerado um dos mais importantes compostos farmacêuticos. Ela e seus derivados são antibacterianos efetivos com poucos efeitos colaterais. As operações de extração e purificação do antibiótico são executadas na seqüência que segue:

- filtração: separação da massa celular do meio, geralmente em filtros rotativos;
- extração por solvente: extração da penicilina do sobrenadante, os solventes são orgânicos como acetato de butila a valores de pH (2,5-3);
- purificação: realizada por tratamento com carvão ativado, cristalização, etc.

### **2.5.3.2 Cefalosporina C**

Barboza (2000) fizeram o estudo da purificação da cefalosporina C, proveniente de caldo fermentativo, em coluna de leito fixo utilizando a resina não iônica Amberlite XAD-2. O processo de adsorção pôde ser avaliado em termos de fator de purificação e fator de concentração. A diminuição da temperatura de 25 para 10°C a um pH de 3,6 favoreceu o processo de adsorção. Assim nas melhores condições de operação da coluna de leito fixo, temperatura de 10°C e pH 3,6, os autores obtiveram um fator de concentração de cefalosporina C de 7,6 e um fator de purificação de 4,7, considerados bons valores na purificação de antibióticos.

### **2.5.3.3 Ácido Clavulânico**

Butterworth (1984) sugeriu dois procedimentos adequados para separação e purificação de ácido clavulânico em larga escala.

Ao final da fermentação o caldo é clarificado por filtração ou centrifugação e o micélio de *Streptomyces clavuligerus* é descartado. Uma extração primária do clarificado proveniente do caldo de fermentação pode ser efetuada por uma variedade de métodos; dois processos (Figura 7) aptos para uso em larga escala são: (1) extração por acidificação do caldo de fermentação usando um solvente orgânico imiscível na fase aquosa e (2) adsorção sobre uma resina de troca iônica de base forte seguida por eluição em uma solução salina. A purificação é realizada posteriormente pelos processos de cromatografia, particularmente pela cromatografia de troca iônica. Ao final do processo um produto de alto grau de pureza é obtido por liofilização ou cristalização da solução aquosa.

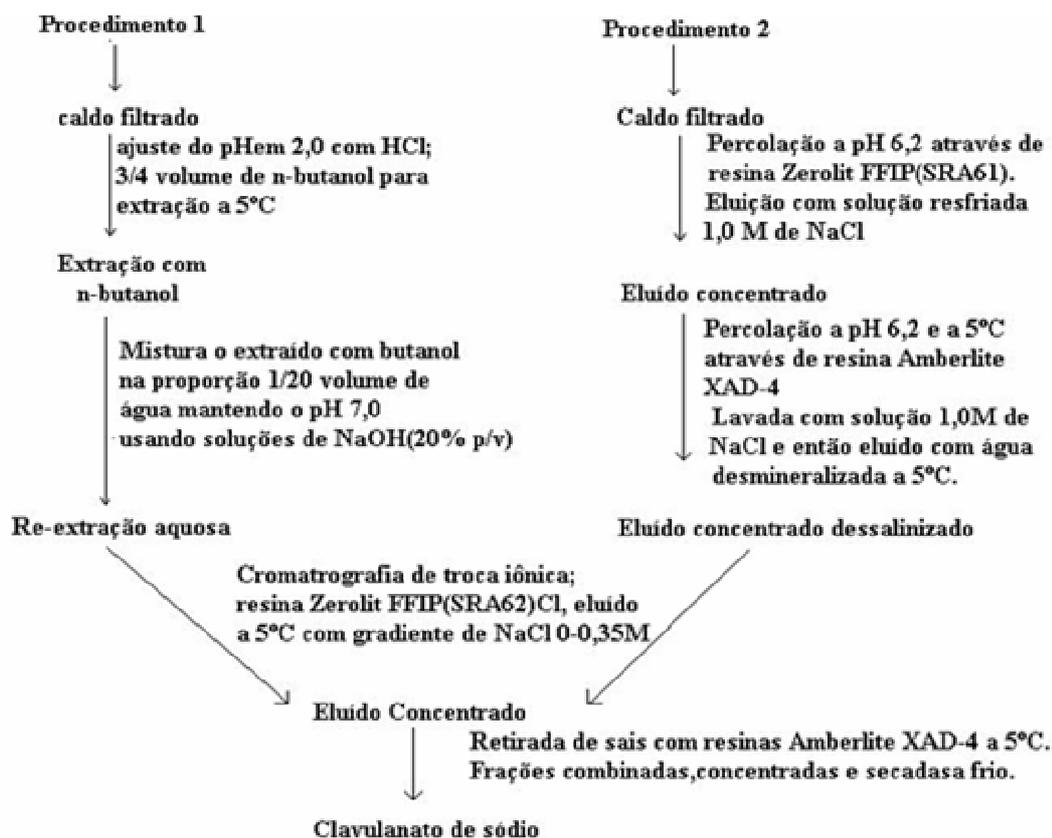


Figura 7: Esquema de separação do ácido clavulânico (Butterworth, 1984).

No primeiro método descrito por Butterworth (1984) o caldo fermentativo tem seu pH reduzido e a extração do AC é realizada utilizando-se um solvente orgânico, onde ocorre a separação das fases. A fase orgânica que contém o AC é misturada então com uma solução de NaOH para neutralização em pH 7,0. Finalmente o extrato é passado em uma coluna de leito fixo recheada com resina Amberlite XAD-4 para desmineralizar o meio, sendo então obtido o clavulanato de sódio. O segundo método mostra a adsorção em uma resina aniônica fortemente básica e eluição da coluna com solução aquosa de um sal, seguindo-se etapas de adsorção em resinas XAD-4 e Zerolite SRA 62. O meio é finalmente desmineralizado em resina XAD-4. O produto final com alta pureza é obtido por liofilização ou por cristalização da solução aquosa.

A patente US4110165 (Cole et al., 1978) descreveu que o ácido clavulânico pode ser extraído do caldo de fermentação filtrado por diversos métodos. No processo de extração por

solvente a solução filtrada deve ser resfriada e o pH abaixado até a região de 2-3, pela adição de ácido, enquanto esta solução é misturada com um solvente orgânico como n-butilacetato ou n-butanol ou etilacetato.

Depois da separação de fases por centrifugação o AC é extraído de volta para uma solução aquosa de tampão fosfato ou bicarbonato de sódio e o pH fica em torno de 7,0. Esse extrato aquoso pode ser concentrado com pressão reduzida gerando um sal de AC. Esse sal é estável quando armazenado como um sólido seco a -20°C. Quando se utiliza o processo com resina de troca iônica, o filtrado, em pH neutro 6-7, percola por uma coluna com uma resina tipo Amberlite IR4B ou Zerolite FFIF até a saturação da coluna que depois deve ser lavada com água e eluída com cloreto de sódio.

Videira & Aires - Barros (1994) apud (Hirata, 2003) citam que o ácido clavulânico é isolado e purificado do meio de fermentação passando por vários estágios. Primeiro estágio envolve a clarificação do meio por filtração ou centrifugação, seguida por adsorção ou extração líquido-líquido por solvente orgânico (normalmente butanol). Mais adiante a purificação é alcançada por cromatografia de troca iônica e, devido à natureza instável do ácido clavulânico, esse é isolado como sal de potássio ou sódio.

Nabais e Cardoso (1995) fizeram o estudo da ultrafiltração de caldos fermentados e a extração por solvente de antibióticos. Os autores constataram que o processo convencional de isolamento do AC a partir de caldos fermentados incluía os seguintes passos: tratamento do caldo com adição de floculantes; separação sólido-líquido com filtros rotativos à vácuo, adição de um auxiliar de filtração; extração do antibiótico com solvente seguido dos processos de purificação, re-extração para uma solução aquosa, concentração e cristalização.

Os autores compararam a extração do ácido clavulânico com n-butanol e pH 2,0 proveniente de dois processos: do caldo filtrado com adição do auxiliar de filtração e do caldo ultrafiltrado. Foi observado que a extração global do antibiótico usando ultrafiltração e filtração são similares. Porém a ultrafiltração traz diversos benefícios aos processos tais como separação de fases mais fácil, redução das perdas de solvente e geração de efluentes de extração mais limpos. A

ultrafiltração traz a desvantagem de aumentar a diluição do produto devido à diafiltração, recomendando-se uma concentração deste por osmose reversa antes da etapa de extração por solvente. É importante comentar que o processo de extração do AC (com solvente orgânico) é sempre problemático quanto à degradação devido ao baixo pH utilizado.

Mayer *et al* (1996), fizeram o estudo da purificação do AC por sistemas de par iônico. Alguns estudos preliminares mostraram uma fraca interação entre o ácido clavulânico e a superfície apolar dessas resinas, como consequência da estrutura química do antibiótico. Nesse sistema as resinas XAD foram testadas em combinação com sais de amônio quaternário possuindo diferentes polaridades e formando pares iônicos com o grupo ácido da molécula de AC. Para se comparar o desempenho desse sistema foram feitos testes com a resina de troca iônica, a Amberlite IRA 400. Os autores constataram que o uso da cromatografia com formação de par iônico é uma alternativa viável e eficiente na purificação de AC. A resina Amberlite XAD4 (com sais de amônio quaternário) apresentou melhor desempenho que a IRA 400. Os resultados obtidos para o sistema utilizando a resina de troca iônica em coluna de leito fixo a partir de caldo fermentado foram um fator de concentração de 2,0 e fator de purificação de 1,64 e os rendimentos não passaram de 65%.

Mayer *et al.* (1997) relataram o estudo da difusividade do AC em sistema de adsorção porosa com par iônico. Os estudos foram feitos em três sistemas: de par iônico XAD4 - ABDA (resina - sal de amônio quaternário), de carvão ativado e de troca iônica com a resina IRA 400. Foi observado que o sistema com carvão ativo é o menos vantajoso devido a sua estrutura microporosa que impede a passagem do AC. As resinas XAD4 e IRA 400 exibem melhores propriedades estruturais permitindo uma rápida adsorção. O sistema de par iônico com a resina XAD4 - ABDA mostra algumas vantagens em relação ao sistema de troca iônica, pois é um sistema com sensibilidade relativamente baixa à variação das condições operacionais. Sua difusividade é menos influenciada pela temperatura e a presença de componentes competitivos no meio é menos prejudicial à cinética de adsorção, significando que o sistema é mais seletivo para o ácido clavulânico.

A Patente US6172221 (Simon, 2001) relata o processo de extração líquido-líquido do ácido clavulânico. Em particular a invenção mostra o processo em que uma primeira fase líquida que

contém o soluto dissolvido é colocada em contato com uma segunda fase líquida que seja também um solvente para o soluto, mas imiscível com a primeira fase líquida; o soluto então é extraído para segunda fase líquida. Em alguns processos conhecidos o soluto orgânico dissolvido (em baixa concentração) em um solvente orgânico é colocado em contato com um meio aquoso para extrair o soluto do solvente orgânico e para formar uma solução aquosa concentrada. Este procedimento é chamado de re-extração. Processos em que o meio aquoso fica recirculando, a corrente do meio aquoso é colocada em contato com a corrente do soluto dissolvido no solvente orgânico, extraindo desse modo uma proporção substancial do soluto que está dissolvido no solvente.

De certa forma neste processo de circulação, o meio aquoso circula diversas vezes de modo que a concentração do soluto no meio aquoso aumente até atingir um ótimo. Um problema, associado com tais processos de extração, é que alguns solutos são relativamente instáveis em meios aquosos e em solventes orgânicos comumente usados. Isto é particularmente importante no caso de compostos farmacêuticos, que são frequentemente sensíveis a hidrólises quando em solução. O ácido clavulânico é um típico exemplo desses compostos instáveis.

O ácido clavulânico ou os seus sais podem ser extraídos diretamente do meio de cultura de várias maneiras, mas primeiro os micélios de *Streptomyces clavuligerus* devem ser removidos do meio de cultura, por métodos como filtração ou centrifugação, antes de começar a extração.

A extração do ácido clavulânico ou de seus sais a partir do meio de cultura clarificado pode ser feito por diversas maneiras: extração com solvente onde o meio de cultura tem que ser clarificado e esfriado e o pH ajustado para valores ácidos; utilização de métodos que exploram a natureza aniônica do ácido clavulânico em pH neutro, tal como o uso de resinas de troca iônica. Os processos de extração do ácido clavulânico ou seus sais podem ser naturalmente divididos em um processo preliminar de isolamento seguido por um processo adicional de purificação. Primeiro o ácido clavulânico é extraído em um solvente orgânico a partir do meio de cultura clarificado e frio (que pode ser o caldo bruto) ajustado a um valor de pH ácido entre 1-2, pela adição de um ácido.

Os ácidos usados para abaixar o pH incluem ácidos clorídricos, sulfúricos, nítricos, fosfóricos, etc. os solventes orgânicos apropriados incluem o n-butanol, acetato de etila, acetato de

n-butila e metil-isobutil-cetona, além de outros solventes similares. Metil-isobutil-cetona é um solvente particularmente utilizado na extração, tendo como partida a cultura filtrada e acidificada. Após a separação de fases o ácido clavulânico é encontrado em solução na fase orgânica.

O ácido clavulânico pode ser re-extraído da fase orgânica em uma nova fase aquosa com, por exemplo, sais de metais-alcalinos e metais alcalinos - terrosos, como fosfato de potássio ou carbonato de sódio em água, mantendo o pH neutro, por exemplo 7. O extrato aquoso após a separação das fases, pode ser concentrado a baixas pressões. A liofilização é utilizada para preparar o sal de ácido clavulânico sólido, deve ser feita a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Outros processos de purificação do ácido clavulânico que utilizam aminas orgânicas têm a desvantagem que podem deixar traços de amina no produto final. Os processos de re-extração do AC apresentam um problema, pois o ácido é particularmente sensível em água, levando à degradação. Com isso o invento relata um processo em que o soluto orgânico solúvel em água como um antibiótico beta - lactâmico, por exemplo, a penicilina ou ácido clavulânico, em contato com a corrente do meio aquoso em uma região de mistura, de modo que uma proporção substancial do soluto passe do solvente orgânico para o meio aquoso na região de mistura, a seguir o solvente orgânico e a fase aquosa são separados fisicamente durante uma etapa de separação.

O solvente orgânico deve ser imiscível com o meio aquoso, como a metil-isobutil-cetona do exemplo. Na região de mistura é necessário que o contato seja rápido e eficiente entre os componentes, isto é a fase do solvente orgânico e a fase do meio aquoso, para que o contato seja eficiente à região de mistura deve ter um grau elevado de turbulência. A fase aquosa e a fase do solvente são separadas então fisicamente em uma etapa de separação.

A separação pode ser realizada em separador centrífugo; um tipo especial é a centrífuga de disco. A alta turbulência na região de mistura, permite que o contato seja extremamente rápido, entre a fase orgânica e a fase aquosa. O contato entre as fases na região de mistura e o estágio de separação deve ser o mais rápido possível. Cita tempos entre alguns segundos e 15 minutos para que não haja degradação do ácido. A relação entre os volumes do meio aquoso e a fase do solvente orgânico pode, por exemplo, estar na proporção de 1:50 até 1:200. Isto ajuda a reduzir o tempo em

que o soluto permaneça no meio aquoso e pode desse modo reduzir a hidrólise do soluto. Por fim, a purificação do ácido foi feita utilizando resinas de troca iônica, por exemplo, a Amberlite 120 IR. A eluição pode ser feita com sais de sódio, potássio ou de cálcio.

Hirata (2003) fez o estudo da purificação e separação do ácido clavulânico através da extração em um sistema de duas fases aquosas PEG – fosfato. O maior coeficiente de partição foi de 15,5 para um sistema contendo PEG 6000 em pH 7; e 3,7 em pH 6. O melhor valor de recuperação do ácido clavulânico na fase PEG foi de 94% obtido em um sistema contendo PEG 400 em pH 7 e um fator de concentração de 2,13. Pode-se observar neste trabalho que conforme se aumenta o pH e o peso molecular do PEG, aumenta o coeficiente de partição do ácido clavulânico, mas deve-se cuidar o aumento do pH, pois aumenta a degradação do ácido clavulânico.

Através do exposto na revisão bibliográfica, pode-se constatar que não está claramente definido na literatura um processo de separação e purificação de ácido clavulânico que possa ser aplicado em escala industrial. Dados a respeito da extração líquido - líquido, bem como os parâmetros necessários para o projeto de equipamentos não são encontrados na literatura. O mesmo é verificado nas etapas de purificação por troca-iônica e adsorção. Desta forma, fica evidente a importância do desenvolvimento desta hipótese de trabalho, que foi propor a seqüência de um processo que aplique a extração líquida líquido, como uma etapa de extração/concentração e em seguida se aplique a troca iônica e a adsorção como etapas de um processo de purificação.

## **3. MATERIAS E MÉTODOS**

### **3.1 Materiais**

#### **3.1.1 Microrganismo**

O microrganismo utilizado para obtenção de ácido clavulânico foi a linhagem de *Streptomyces clavuligerus* ATCC 27064. O microrganismo foi armazenado em criotubos a  $-70^{\circ}\text{C}$  em ultrafreezer usando glicerol (20% v/v) como crioprotetor (Gouveia et al.,1999).

#### **3.1.2 Resina**

As resinas utilizadas foram cedidas pela Rohm & Haas Química Ltda ou adquiridas.

- Resina de troca iônica: Amberlite IRA 400.
- Resina hidrofóbica: Amberlite XAD-4.

### **3.2 Equipamentos**

Durante o desenvolvimento do trabalho, foram utilizados equipamentos disponíveis no laboratório de Engenharia Bioquímica do DEQ/UFSCar, sendo:

#### **3.2.1 Cromatógrafo líquido de alta eficiência**

A análise da concentração de AC foi realizada através do uso de Cromatógrafo de fase líquida de alta eficiência empregando detector Waters 996 PDA, injetor automático 717 e coluna e pré-coluna C-18  $\mu\text{Bondapa ck}$ .

#### **3.2.2 Coluna de leito fixo**

Para realização de ensaios em leito fixo foram utilizadas duas colunas encamisadas da Pharmacia modelo SR-10/50 e XK-16/40.

### **3.2.3 Banho termostatizado**

Durante os ensaios foram utilizados banhos termostatizados para manter em temperatura constante todo meio contendo AC.

### **3.2.4 Centrífuga refrigerada**

Centrífuga refrigerada da marca Eppendorf Centrifuge 5403, com capacidade para seis tubos foi utilizada para tratamento do caldo fermentativo e obtenção da solução de ácido clavulânico.

### **3.2.5 Ultrafreezer**

A armazenagem e conservação do microrganismo em criotubos, do meio de fermentação e das amostras dos ensaios de adsorção foram feitas por estocagem a uma temperatura de  $-70^{\circ}\text{C}$  em ultrafreezer da marca Forma Scientific.

### **3.2.6 Espectrofotômetro**

O espectrofotômetro digital UV/VIS Pharmacia Biotech Ultrospec 2000 foi utilizado para a quantificação de contaminantes.

### **3.2.7 Outros equipamentos**

Demais equipamentos utilizados em laboratórios químicos e bioquímicos tais como: balança analítica digital, pHmetro digital, agitador magnético, estufas, bombas peristálticas, computadores entre outros, foram utilizados.

## **3.3 Métodos**

### **3.3.1 Obtenção de soluções de ácido clavulânico**

Nos estudos de separação e purificação do ácido clavulânico, o ácido foi obtido de duas diferentes fontes: clavulanato de potássio do produto farmacêutico Clavulin (suspensão oral de 5ml

contém 62,5mg de clavulanato de potássio e 250mg de amoxicilina), produzida por Smithkline Beecham Laboratórios Ltda., Rio de Janeiro, Brasil; e ácido clavulânico de caldo fermentativo.

### 3.3.2 Tratamento do caldo fermentado

O caldo cultivado contendo micélios foi centrifugado por 15 minutos a 1000 g e 10°C para a separação das células. O sobrenadante foi recolhido e acidificado com ácido sulfúrico até pH 3,5 para precipitação dos sólidos em solução, sendo novamente centrifugado nas mesmas condições da primeira centrifugação, e por fim filtrado com filtros de 0,45µm de tamanho de poro. A solução resultante da filtração foi armazenada a pH 6,2; em ultrafreezer a -70°C.

### 3.3.3 Análise da concentração de ácido clavulânico

A concentração de ácido clavulânico presente no efluente da coluna foi determinada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) segundo o método descrito por Foulstone e Reading, 1982 com reação com imidazol. Foi utilizada uma coluna C-18 µ-Bondapak (3,9 x 300 mm) e o equipamento foi operado dentro das seguintes condições: temperatura 28°C e fluxo 2,5 mL.min<sup>-1</sup>.

Os resultados foram obtidos utilizando-se uma curva de calibração construída a partir do padrão de ácido clavulânico, soluções na forma de clavulanato de potássio obtidas a partir do produto farmacêutico Clavulin® (Suspensão oral 5 mL contém 62,5 mg de clavulanato de potássio e 250 mg de amoxicilina), produzido por SmithKline Beecham Laboratórios Ltda., Rio de Janeiro, Brasil. A fase móvel era composta de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0,1 M) e 6% de metanol em pH 3,2 com ácido fosfórico. A Figura 8 mostra o esquema de reação de ácido clavulânico com imidazol.

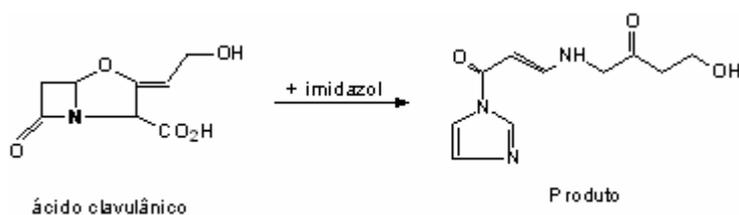


Figura 8: Esquema de reação do AC com imidazol (Eckers et al., 1996).

No procedimento de derivatização do AC, o imidazol reage com o grupo carbonil do anel  $\beta$ -lactâmico onde é rompida a ligação C-N ocorrendo a formação de uma nova ligação C-N entre o imidazol e o carbono do grupo carbonil. A quebra do anel  $\beta$ -lactâmico também leva a abertura do anel oxazolidina com conseqüente descarboxilação originando o produto mostrado na Figura 8 (Eckers et al., 1996). O produto dessa reação é mais estável que o AC e sua formação é diretamente proporcional à concentração de AC presente na reação e o composto é fortemente absorvido a 312 nm.

### 3.3.4 Análise da concentração de contaminantes

A concentração de contaminantes foi determinada por espectrofotometria a 280nm, descontando-se a concentração de ácido clavulânico nesse comprimento de onda. Para tal, fez-se inicialmente uma curva de calibração para o ácido clavulânico neste comprimento de onda obtendo-se:

$$YAC = 0,00226 + 0,00198 * CAC.$$

A concentração de AC (CAC) medida cromatografia líquida foi utilizada nesta equação, gerando um YAC correspondente. A concentração de contaminantes era então o resultado da leitura no espectrofotômetro menos o valor de YAC obtido.

### 3.3.5 Preparo das soluções estoque de PEG e tampão fosfato

- Solução estoque tampão fosfato a pH 6 com concentração de 30% p/p: Foram dissolvidos 16,97g de fosfato de potássio monobásico (PA) e 13,03g de fosfato dibásico (PA) em 70g de água destilada, totalizando 100g de solução.
- Solução estoque de PEG, com concentração de 50% p/p para PEG de massa molecular 400,600 e 4000: Determinaram-se as massas de 50g de PEG (400,600 e 4000) sendo dissolvidos em 50g de água destilada, totalizando uma solução de 100g.

### 3.3.6 Determinação do coeficiente de partição para os solventes orgânicos

No processo de extração, quando o equilíbrio é atingido ele pode ser adequadamente representando através de um coeficiente de partição  $K_p$ , como exibido na Equação 3.1.

$$K_p = \frac{C_{FO1}}{C_{FA1}} \quad (3.1)$$

Onde  $C_{FO1}$  é a concentração do soluto na fase leve (fase orgânica: FO), e  $C_{FA1}$  é a concentração do mesmo soluto na fase pesada (fase aquosa: FA). O coeficiente de partição é a representação da afinidade do soluto por uma fase em relação à outra.

Para a obtenção do  $K_p$  realizou-se um balanço de massa no sistema, representado na Figura 9.

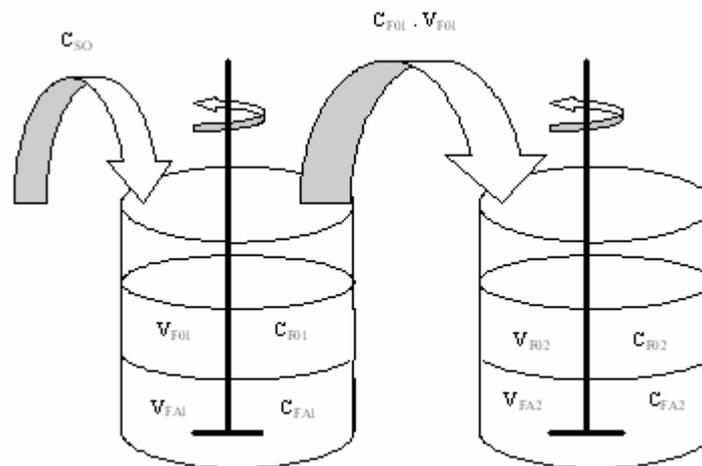


Figura 9: Ilustração de um sistema experimental de extração por solvente, seguida da etapa de re-extração.

Considerando-se que:

$C_{SO1}$ : concentração do soluto na solução original (antes da extração) (g/L);

$C_{FA1}$ : concentração do soluto na primeira fase aquosa (g/L);

$C_{FO1}$ : concentração do soluto na primeira fase orgânica (g/L);

$V_{FA1}$  : volume da primeira fase aquosa (L);

VFO 1: volume da primeira fase orgânica (L);

CFA2: concentração do soluto na segunda fase aquosa (g/L);

CFO 2: concentração do soluto na segunda fase orgânica (g/L);

VFA2 : volume da segunda fase aquosa (L);

VFO 2: volume da segunda fase orgânica (L)

Com o balanço material na etapa extração e re-extração foi possível determinar o coeficiente  $K_p$ . A Equação 3.2 é o balanço de massa na etapa de extração e a Equação 3.3 é o balanço de massa na etapa de re-extração.

$$C_{SO} \cdot V_{FA1} = C_{FA1} \cdot V_{FA1} + C_{F01} \cdot V_{F01} \quad (3.2)$$

$$C_{F01} \cdot V_{F01} = C_{FA2} \cdot V_{FA2} + C_{FO2} \cdot V_{FO2} \quad (3.3)$$

Considerando-se que a concentração de ácido clavulânico na segunda fase orgânica é igual a zero, obtendo-se a Equação 3.4. Em seguida combinando-se a Equação 3.1 e 3.4, obtém-se a Equação 3.5.

$$C_{F01} = \frac{C_{FA2} \cdot V_{FA2}}{V_{FCO}} \quad (3.4)$$

$$\frac{C_{FA2}}{C_{FA1}} = K_p \cdot \frac{V_{F01}}{V_{FA2}} \quad (3.5)$$

Assim tem-se que: quanto maior a concentração do soluto na fase orgânica, maior o valor de  $K_p$  obtido, e isto implica em uma extração mais eficiente.

## **4. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL**

### **4.1 Extração de solvente orgânico**

Os experimentos de extração por solvente orgânico foram realizados na temperatura ambiente em frascos onde a mistura foi feita com agitação mecânica. Inicialmente as amostras de caldo fermentado clarificado, tiveram seu pH ajustado com uma solução de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,1M. Foram realizados experimentos nos pHs 2, 3, 4 e 5. Os solventes orgânicos estudados foram o n-butanol, 2-butanol, acetato de etila, acetato de butila e metil isobutil cetona. Depois de decorrido o tempo de extração, a fase orgânica contendo o ácido clavulânico foi re-extraído para uma solução aquosa de tampão fosfato, a pH 7.

### **4.2 Determinação do coeficiente de partição (K<sub>p</sub>) para os solventes orgânicos**

A partir de uma solução de caldo clarificado a uma concentração de AC conhecida, reduziu-se o pH da solução a 2,0 com uma solução de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,1M. Realizaram-se 5 extrações adicionando-se os solventes à solução, nas seguintes proporções (VFA (mL): VFO (mL)): 1:1, 1:2, 1:3, 2:1 e 3:1. A operação foi realizada sob agitação a temperatura ambiente. Em seguida realizou-se a re-extração com a solução tampão fosfato de pH 7. Foram realizadas 5 re-extrações adicionando-se a solução aquosa na fase orgânica formada, nas seguintes proporções (VFO (mL): VFA (mL)): 1:1, 2:1, 3:1, 1:2 e 1:3. Por fim as amostras foram retiradas das duas fases aquosas formadas tendo a concentração de ácido clavulânico sido determinada pelo método proposto por Foulstone & Reading (1982).

### **4.3 Extração em sistemas de duas fases aquosas**

Os experimentos foram preparados a partir de soluções estoque de PEG de massa molecular 400, 600 e 4000 e tampão fosfato. As soluções foram preparadas em relação a massa e não ao volume, evitando-se assim erros devido a viscosidade das soluções PEG. As soluções estoque de PEG, tampão fosfato e caldo tiveram suas massas determinadas sendo colocadas em tubos de centrifuga graduados de 50 mL, de acordo com a composição do sistema de 50 g. O caldo

fermentado foi adicionado ao sistema já tratado e em pH 6,2. Toda a água do sistema foi substituída por caldo fermentado para minimizar os efeitos de diluição.

Uma vez feito entrar em contato as soluções, os frascos foram agitados em um agitador de vórtice por 50 s e centrifugados a 20°C por 5 minutos a 1000 g para que a separação das fases ocorresse mais rapidamente. Em seguida determinou-se o volume das fases formadas, superior e inferior, retirando-se amostras com o auxílio de uma pipeta automática para terem a composição do AC analisadas.

#### 4.4 Adsorção em coluna de leito fixo

Para realização dos ensaios experimentais foi utilizada uma coluna Pharmacia SR-10-50 com 16 mm de diâmetro interno. O aparato experimental utilizado está representado no esquema simplificado da Figura 10.

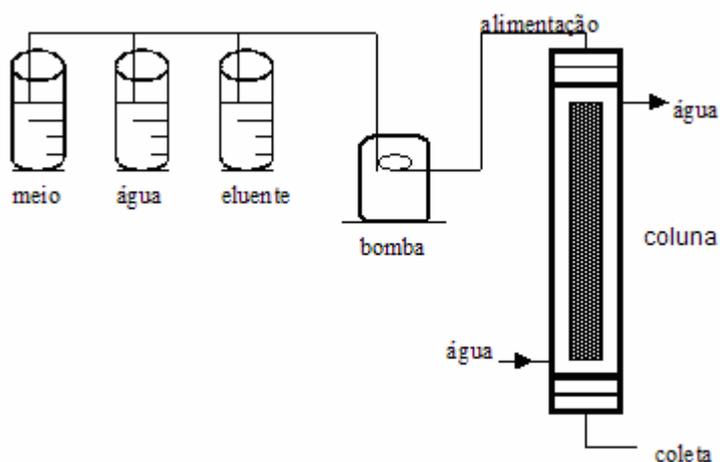


Figura 10: Esquema do aparato experimental utilizado nos ensaios de adsorção.

O equilíbrio térmico na coluna foi atingido com o auxílio de um banho termostatizado a ela acoplado. Uma vez preenchidas com a resina, passaram-se as soluções contendo o ácido clavulânico extraído do meio fermentado por esta coluna. Após a troca iônica faz-se passar água para retirada de solução retida nos interstícios. A eluição do AC foi realizada com uma solução de

NaCl (5% p/v) sendo que houve experimentos onde se utilizou o tampão tris - HCl puro e em outros a solução tris - HCl com NaCl a 5% (p/v).

Em todas as etapas, foi utilizada uma bomba peristáltica que fez a vazão permanecer em torno de 6mL.min<sup>-1</sup>. Amostras da solução eluída na coluna foram coletadas e realizadas a determinação das concentrações de ácido clavulânico e de contaminantes.

Os experimentos foram realizados à temperatura de 10°C e pH 6,2. Os resultados foram analisados em termos dos fatores de concentração, purificação e do rendimento, calculados para cada experimento. Os fatores de concentração (FC), purificação (FP), rendimento (%R) e perdas são calculados utilizando-se as Equações 4.1, 4.2, 4.3 e 4.4, respectivamente.

$$FC = \frac{C}{C_0} \quad (4.1)$$

$$FP = \frac{C \cdot C_{T0}}{C_0 \cdot C_T} \quad (4.2)$$

$$\%R = \frac{V \cdot C}{V_0 \cdot C_0} * 100 \quad (4.3)$$

$$\%P = (1-R) * 100 \quad (4.4)$$

Onde C<sub>0</sub>, C<sub>T0</sub> e V<sub>0</sub> são as concentrações iniciais de AC, contaminantes e volume inicial, respectivamente; e C, C<sub>T</sub> e V são as concentrações e volume desses produtos no efluente da coluna.

#### 4.5 Modelo de um extrator contra - corrente

O modelo matemático utilizado para simulação de um extrator contra-corrente foi obtido através do balanço material para o ácido clavulânico em cada extrator, conforme apresentado na Figura 11.

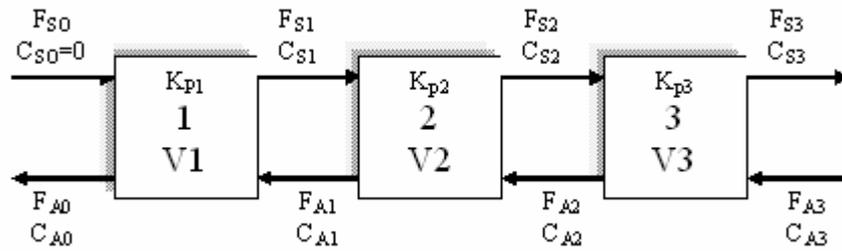


Figura 11: Esquema de um extrator contra-corrente.

Onde:

$C_{S0}$ ,  $C_{S1}$ ,  $C_{S2}$  e  $C_{S3}$ : concentração de AC nas diferentes fases orgânicas (g/L);

$F_{S0}$ ,  $F_{S1}$ ,  $F_{S2}$  e  $F_{S3}$ : vazão de alimentação do solvente orgânico (L/h);

$C_{A3}$ ,  $C_{A2}$ ,  $C_{A1}$  e  $C_{A0}$ : concentração de AC nas diferentes fases aquosas (g/L);

$F_{A3}$ ,  $F_{A2}$ ,  $F_{A1}$  e  $F_{A0}$ : vazão de alimentação da solução aquosa (L/h);

KP: coeficiente de partição nos extratores;

V1: volume no primeiro extrator (L);

V 2: volume no segundo extrator (L);

V 3: volume no terceiro extrator (L).

Duas interpretações foram aplicadas ao problema sendo que em uma se introduz a degradação do AC na fase aquosa e em outra que não se considera a degradação. No modelo considerou-se ainda que não ocorra degradação do AC nas fases orgânicas. Assim, as principais considerações adotadas para o extrator foram:

- Para o caso em que se considere a degradação utilizou-se a cinética tal como descrito por Bersanetti et al, 2005;
- Extratores perfeitamente agitados;
- Sistemas Isotérmicos;
- $C_{S0}$  e  $C_{A3}$  conhecidos.
- Regime Permanente;
- Extratores de mesmo volume ( $V_1 = V_2 = V_3$ ).

Os valores das vazões de alimentação foram calculados com base nos diferentes tempos de residência e do volume de cada extrator previamente estabelecido.

#### 4.5.1 Modelo considerando-se a degradação do ácido clavulânico na fase aquosa

Balço de massa para o AC fornece:

$$F_{SO} \cdot C_{SO} + F_{A1} \cdot C_{A1} = F_{AO} \cdot C_{AO} + F_{S1} \cdot C_{S1} + K_d \cdot C_{A0} \cdot \frac{V_1}{2} \quad (4.5)$$

$$F_{S1} \cdot C_{S1} + F_{A2} \cdot C_{A2} = F_{A1} \cdot C_{A1} + F_{S2} \cdot C_{S2} + K_d \cdot C_{A1} \cdot \frac{V_2}{2} \quad (4.6)$$

$$F_{S2} \cdot C_{S2} + F_{A3} \cdot C_{A3} = F_{A2} \cdot C_{A2} + F_{S3} \cdot C_{S3} + K_d \cdot C_{A2} \cdot \frac{V_3}{2} \quad (4.7)$$

Dividindo-se as equações 4.5 a 4.7 pelos seus respectivos volumes se obtêm as equações 4.8 a 4.10.

$$\frac{F_{SO}}{V_1} \cdot C_{SO} + \frac{F_{A1}}{V_1} \cdot C_{A1} = \frac{F_{AO}}{V_1} \cdot C_{AO} + \frac{F_{S1}}{V_1} \cdot C_{S1} + 0,5 \cdot K_d \cdot C_{A0} \quad (4.8)$$

$$\frac{F_{S1}}{V_2} \cdot C_{S1} + \frac{F_{A2}}{V_2} \cdot C_{A2} = \frac{F_{A1}}{V_2} \cdot C_{A1} + \frac{F_{S2}}{V_2} \cdot C_{S2} + 0,5 \cdot K_d \cdot C_{A1} \quad (4.9)$$

$$\frac{F_{S2}}{V_3} \cdot C_{S2} + \frac{F_{A3}}{V_3} \cdot C_{A3} = \frac{F_{A2}}{V_3} \cdot C_{A2} + \frac{F_{S3}}{V_3} \cdot C_{S3} + 0,5 \cdot K_d \cdot C_{A2} \quad (4.10)$$

$$K_{P1} = \frac{C_{S1}}{C_{A0}} \quad (4.11)$$

$$K_{P2} = \frac{C_{S2}}{C_{A1}} \quad (4.12)$$

$$K_{P3} = \frac{C_{S3}}{C_{A2}} \quad (4.13)$$

O modelo está representado por equações algébricas e lineares (Equações de 4.8 a 4.13), e esse sistema de equações algébricas lineares foi implementado no software MatLab (Math Works, 1998).

#### 4.5.2 Sem degradação do ácido clavulânico fase aquosa

Balço de massa para o AC fornece:

$$F_{SO} \cdot C_{SO} + F_{A1} \cdot C_{A1} = F_{AO} \cdot C_{AO} + F_{S1} \cdot C_{S11} \quad (4.14)$$

$$F_{S1} \cdot C_{S1} + F_{A2} \cdot C_{A2} = F_{A1} \cdot C_{A1} + F_{S2} \cdot C_{S2} \quad (4.15)$$

$$F_{S2} \cdot C_{S2} + F_{A3} \cdot C_{A3} = F_{A2} \cdot C_{A2} + F_{S3} \cdot C_{S3} \quad (4.16)$$

O modelo sem considerar a degradação do AC está representado pelo sistema de equações algébricas lineares (Equações 4.11 a 4.13 e 4.14 a 4.16). A codificação dos modelos dos extratores para a implementação em MatLab encontra-se no Apêndice A.

## 5. RESULTADOS

Apresentam-se a seguir os resultados quanto à obtenção dos valores das constantes de partição para os solventes n-butanol, acetato de etila, acetato de butila, 2-butanol e metil isobutil cetona. Na seqüência foram feitos os estudos da influência de pH e volume na extração com solvente orgânico. Seguindo-se as etapas de extração com solvente orgânico realizou-se a purificação por troca iônica. Para o experimento E1 foi ainda realizadas a adsorção com resina XAD-4, onde se apresentam os resultados de FC, FP e R. Os experimentos E2, E3, E4, F1, F2, F3 e F4 não foram realizados por adsorção em XAD-4. Estudou-se a extração em SDFa onde foram determinados os valores de  $K_p$ , FC, FP, R e P sendo estes comparados com as extrações com solventes orgânicos. Por fim apresenta-se a simulação de um sistema de extração em contracorrente onde se determinou o número de estágios necessários para a extração e o mínimo tempo de residência necessário para que ocorra a extração.

### 5.1 Determinação do coeficiente de partição ( $K_p$ ) para extração por solvente orgânico

Neste item foi determinado o coeficiente de partição para diferentes solventes orgânicos (acetato de etila, acetato de butila, metil isobutil cetona, 2-butanol e n-butanol), conforme o balanço material descrito no item 3.3.6.

Os resultados da concentração de ácido clavulânico na primeira e na segunda fase aquosa, nas diferentes razões de volume para o solvente orgânico acetato de etila, estão na Tabela 5.1.

Tabela 5.1: Resultados da extração do ácido clavulânico com o solvente orgânico acetato de etila.

VFO1: VFA2 (mL:mL)	CAC 1ª FA (mg.L-1)	CAC 2ª FA (mg.L-1)
1:1	69,4	34,9
2:1	47,5	54,5
3:1	35,8	63,05
1:2	70,2	23,4
1:3	76,3	22,9

Com os resultados da Tabela 5.1 e com a Equação 3.5, pode-se obter o gráfico da Figura 12.

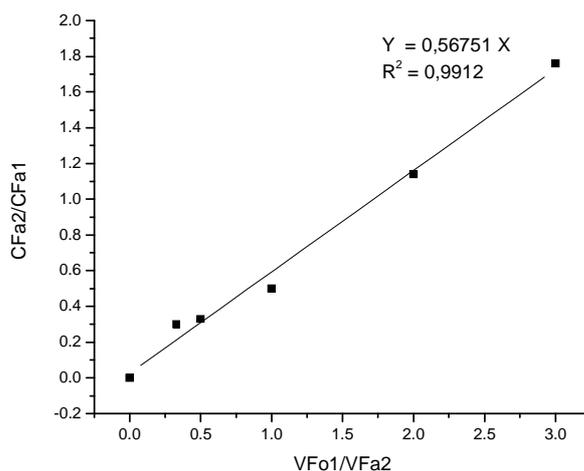


Figura 12: Ajuste da Equação 3.5 aos dados experimentais para a determinação do  $K_p$  para o sistema ácido clavulânico e acetato de etila

Os resultados da concentração de ácido clavulânico na primeira e na segunda fase aquosa, nas diferentes razões de volume para o solvente orgânico n-butanol, estão na Tabela 5.2.

Tabela 5.2: Resultados da extração do ácido clavulânico com o solvente orgânico n-butanol.

$V_{FO1} : V_{FA2}$ (mL:mL)	$C_{AC}$ na 1ª FA ( $mg.L^{-1}$ )	$C_{AC}$ na 2ª FA ( $mg.L^{-1}$ )
1:1	69,0	83,5
2:1	Traços	105,9
3:1	23,5	97,9
1:2	83,7	60,9
1:3	103,0	40,2

Com os resultados da Tabela 5.2 e com a Equação 3.5, pode-se obter o gráfico da Figura 13.

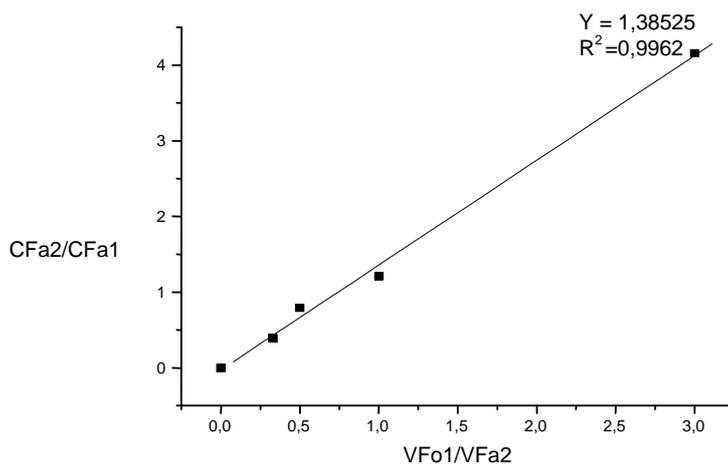


Figura 13: Ajuste da Equação 3.5 aos dados experimentais para a determinação do  $K_p$  para o sistema ácido clavulânico e n-butanol.

Os resultados de coeficiente de partição utilizando a Equação 3.5, obtidos para os solventes orgânicos acetatos de butila, 2-butanol e metil-isobutil-cetona, estão na Tabela 5.3.

Tabela 5.3: Resultados obtidos do coeficiente de partição para os solventes: acetato de butila, 2-butanol e metil isobutil cetona.

Solvente orgânico	Acetato de butila	2-butanol	Metil-isobutil-cetona
$C_{AC}$ 1ª FA (mg.L <sup>-1</sup> )	205,4	84,7	113,5
$C_{AC}$ 2ª FA (mg.L <sup>-1</sup> )	105,0	208,1	180,7
$V_{Fo1}$ (mL)	40	27	200
$V_{FA2}$ (mL)	15	10	40
Kp	0,19	0,91	0,32

Na Tabela 5.4 apresentam-se os resultados obtidos para o Kp, as constantes dielétricas e a polaridades para os solventes utilizados nas extrações.

Tabela 5.4: Valores do coeficiente de partição Kp, obtidos e da constante dielétrica e polaridade para os solventes orgânicos utilizados tal como tabelados por West et al (1984)

Solventes	Kp	Constante Dielétrica	Polaridade (P)
Acetato de butila	0,19	5,01	4,0
Metil –isobutil -cetona	0,32	13,11	4,2
Acetato de etila	0,56	6,02	4,4
2-butanol	0,91	15,8	
n-butanol	1,38	17,51	3,9

Através da análise dos resultados apresentados nas Figuras 12 e 13 bem como os encontrados na Tabela 5.3, foi possível observar que o maior valor obtido para o coeficiente de partição foi em relação ao n-butanol. Com base neste resultado e levando-se em conta as características físico-químicas das moléculas, conclui-se que o Kp irá depender da interação soluto-solvente, bem como do momento dipolar das moléculas e da constante dielétrica do meio. O AC

possui em sua estrutura 2 grupos hidroxila permitindo interações intermoleculares através de pontes de hidrogênio.

A dissolução de substâncias, como o ácido clavulânico, é favorecida em solventes polares que possam realizar pontes de hidrogênio, como os álcoois. Solventes como o acetato de etila e outros ésteres realizam interações intermoleculares mais fracas (dipolo-dipolo) em relação às pontes de hidrogênio, por isso apesar de apresentarem maior polaridade, apresenta baixa constante dielétrica e uma fraca interação soluto (AC) - solvente.

## 5.2 Extração do ácido clavulânico com acetato de etila

A influência do pH na extração com solventes orgânicos foi verificada através da realização do experimento com acetato de etila. Neste estudo além da influência do pH foram analisadas as relações de volumes para a extração.

### 5.2.1 Influência do pH

Realizaram-se quatro ensaios variando-se o pH da solução inicial de ácido clavulânico. Os resultados experimentais obtidos para esses ensaios estão na Tabela 5.5. Em todos os ensaios a concentração inicial de ácido clavulânico foi de 276,4 mg.L<sup>-1</sup>, os volumes das fases aquosas e orgânicas foram de 10 mL e o tempo de extração e re-extração foi de 30 minutos para cada ensaio.

Tabela 5.5: Resultados obtidos para a concentração de ácido clavulânico na 1ª fase aquosa, nos diferentes pHs verificados.

pH	C <sub>AC</sub> 1ª FA (mg.L <sup>-1</sup> )	C <sub>AC</sub> 2ª FA (mg.L <sup>-1</sup> )	Kp
2	131,2	74,4	0,56
3	258,9	31,0	0,12
4	271,4	0	0
5	273,6	0	0

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 5.5, observa-se que há influência do pH na etapa de extração do ácido clavulânico, esta influencia se dá justamente no equilíbrio da reação de ionização do ácido. Vieira e Badino (2003) determinaram a constante de ionização, pKa, para o AC como sendo de 2,25 que é análogo ao pH da solução de ácido clavulânico como sendo igual a 2,25. Como no processo de extração somente o ácido clavulânico na forma de ácido, isto é, não ionizada, O AC é extraído para a fase orgânica, é necessário que o pH da solução seja baixo. Isto ocorre quando o pH é mantido abaixo do pKa da solução durante a extração. Portanto, pode-se concluir que o melhor pH para a extração é o de 2,0.

### 5.2.2 Influência dos volumes

Foram realizados 3 ensaios. Os sistemas estudados e os resultados estão descritos na Tabela 5.6. A concentração inicial do ácido clavulânico de 181,80 mg.L<sup>-1</sup> após redução do pH para 2.

Tabela 5.6: Resultados obtidos para a concentração de ácido clavulânico na primeira e segunda fase aquosa e seus respectivos fatores de concentração, fatores de purificação e rendimento.

Ensaio	V <sub>FO</sub> : V <sub>FA</sub> (mL: mL)	C <sub>AC</sub> 1 <sup>a</sup> FA (mg.L <sup>-1</sup> )	C <sub>AC</sub> 2 <sup>a</sup> FA (mg L <sup>-1</sup> )	V <sub>1<sup>o</sup>FA</sub> (mL)	V <sub>2<sup>o</sup>FA</sub> (mL)	FC (-)	FP (-)	R (%)	Kp (-)
1	100:100	103,4	207,5	100	13	1,1	28,3	14,8	0,26
2	(33-33-34): 100	80,8	246,2	100	13	1,4	38,0	17,6	0,39
3	50:100	119,3	187,3	100	13	1,0	21,0	13,4	0,40

Pelos resultados apresentados na Tabela 5.6 foi possível observar que para o experimento 3, que apresenta menor volume de fase orgânica em relação à fase aquosa, e o experimento 2, realizado com mesmos volumes entre as duas fases, porém com a fase orgânica dividida em três frações, apresentaram os mesmos resultados para o Kp. No entanto, para o experimento 1, com a mesma relação entre os volumes, se obteve o menor Kp, esse fato possivelmente ocorreu devido o tempo de contato das fases ter sido insuficiente para que se atingisse o equilíbrio. Neste caso é

possível concluir que o coeficiente de partição ( $K_p$ ) independe dos volumes das fases postas em contato.

Em termos operacionais, pode-se concluir que volumes iguais exigem um maior tempo de contato, nas mesmas condições de mistura realizadas nos experimentos. Nestes termos, poder-se-ia concluir que operações tal como as realizadas no experimento 3 fossem mais convenientes, tendo em vista um menor consumo de solvente orgânico, o que implicaria em menor custo para o processo, bem como uma redução de resíduos gerados. No entanto há que se considerarem ainda os resultados obtidos para o fator de concentração (FC), fator de purificação (FP) e o rendimento (R).

Neste sentido, observando-se os resultados dos experimentos 2 e 3, verifica-se que as relações de volume influenciaram diretamente no fator de concentração e conseqüentemente no fator de purificação e rendimento, sendo que os melhores resultados foram os obtidos pelo experimento 2. Pode-se concluir que um procedimento tal realizado no experimento 2 é aquele que deva ser aplicado, desta forma definiu-se esta metodologia como aquela a se utilizar nas extrações com solvente orgânico.

### **5.2.3 Extração do ácido clavulânico com acetato de etila seguida de adsorção em coluna de leito fixo**

Neste item apresentam-se os resultados do estudo da extração do ácido clavulânico do meio fermentado, seguida de adsorção em colunas empacotadas com a resina de troca iônica, Amberlite IRA 400, e resina hidrofóbica, Amberlite XAD 4. Para cada operação foram avaliados, os fatores de concentração, purificação e rendimento para o processo.

Na extração por solvente orgânico foram investigadas diferentes condições experimentais. Após a extração com o solvente orgânico, foi realizadas uma re-extração com uma solução de tampão fosfato a pH 7. A solução de ácido clavulânico concentrado foi alimentada em uma coluna de leito fixo recheada com a resina de troca iônica, a uma temperatura de 10°C. Após a adsorção a coluna foi lavada com água milli Q, sendo finalmente eluída com uma solução de NaCl 5% (p/v) a vazão de alimentação em torno de 6 mL.min<sup>-1</sup>.

Na etapa de adsorção, as amostras foram retiradas de 10 em 10 mL e na etapa de dessorção retiradas de 2,5 em 2,5 mL. O volume coletado na etapa de dessorção, que corresponde à região de maior concentração de ácido clavulânico, foi recolhido e alimentado na coluna com a resina hidrofóbica (Amberlite XAD-4). Nesta etapa, após a adsorção, a coluna também foi lavada com água milli Q para retirar a solução retida nos interstícios e, em seguida, foi realizada a eluição com uma solução de etanol 10% (v/v). As amostras foram coletadas com mesmo volume na adsorção e dessorção em torno de 2 a 3 mL, dependendo do volume total alimentado na coluna.

No experimento E1 foi realizada a extração do ácido clavulânico seguindo as etapas de troca iônica e adsorção não específica. As condições experimentais foram:

- Troca iônica com a resina Amberlite IRA-400: raio da coluna de 0,5 cm; altura de leito de 21 cm e vazão em torno de 5mL.min<sup>-1</sup>.
- Adsorção sobre a resina Amberlite XAD-4: raio da coluna de 0,25 cm; altura de leito de 10 cm e vazão em torno de 1,45 mL.min<sup>-1</sup>.

Os resultados experimentais obtidos no experimento E1 estão representados na Tabela 5.7.

Tabela 5.7: Resultados obtidos de fator de concentração, fator de purificação e rendimento para a etapa de extração e as etapas de adsorção no ensaio E1.

E 1	C <sub>ACi</sub> (mg.L <sup>-1</sup> )	C <sub>ACf</sub> (mg.L <sup>-1</sup> )	CT <sub>i</sub> (-)	CT <sub>f</sub> (-)	FC (-)	FP (-)	Vi (mL)	VF (mL)	R (%)
Extração	184,1	352,6	3,29732	2,02669	1,9	3,1	300	40,0	25,5
IRA – 400	352,6	337,9	2,02669	0,18780	1,0	10,3	40	2,5	6,0
Global	255,6	152,0	0,21565	<0,00226	0,6	> 56,7	5	2,0	23,8

No ensaio E2 foi realizada a extração do ácido clavulânico seguida do experimento de troca iônica em coluna de leito fixo com a resina Amberlite IRA-400. As condições operacionais foram, raio de 0,75cm, altura de 21cm e vazão em torno de 5,45 mL.min<sup>-1</sup>. Os resultados experimentais obtidos no ensaio E2 estão representados na Tabela 5.8.

Tabela 5.8: Resultados obtidos de fator de concentração, fator de purificação e rendimento para a etapa de extração e as etapas de adsorção, no ensaio E2.

E 2	$C_{ACi}$ (mg.L <sup>-1</sup> )	$C_{ACf}$ (mg.L <sup>-1</sup> )	$CT_i$ (-)	$CT_f$ (-)	FC (-)	FP (-)	$V_i$ (mL)	$V_f$ (mL)	R (%)
Extração	269,32	271,76	3,26649	1,33365	1,0	2,4	300	104	35,0
IRA – 400	271,76	143,66	1,33365	< 0,00226	0,5	312,6	40	2,5	3,3
Global	269,32	6,24	3,26649	0,01539	0,02	4,2	300	3	0,02

Pelos resultados apresentados na Tabela 5.7, pode-se observar que a etapa de extração permitiu concentrar o ácido clavulânico em solução. Quanto ao fator de purificação verifica-se, pelos resultados apresentados nas Tabelas 5.7 e 5.8, que ocorre a separação de compostos que apresentem baixa solubilidade no solvente, proporcionando assim, uma purificação primária do caldo clarificado. A troca iônica realizada no experimento E2, onde se utilizou um volume maior de resina que no experimento E1, promoveu um valor de fator de purificação maior, visto que neste caso não ocorrem perdas pela saturação da coluna.

Nesta etapa de purificação por troca iônica não foi possível concentrar o ácido clavulânico em virtude de que na etapa de lavagem com água milli Q, ocorreram perdas de AC. Deve-se levar em conta, também, que o AC sofre degradação durante o processo de adsorção tal como discutido por Mayer et al (1996). Os rendimentos extremamente baixos obtidos nos experimentos E1 e E2 na etapa de purificação por troca iônica foi devido, não se ter sido recolhido todo o volume alimentado de AC na fase da dessorção, assim seria necessário que todo o volume alimentado fosse coletado na dessorção, para se obter resultados mais adequados com relação ao rendimento.

A Figura 14 representa a concentração de AC e contaminantes com o tempo, durante a adsorção e eluição sobre a resina Amberlite IRA-400. Na Figura 15 são representados dados de concentrações com o tempo na saída da coluna para a purificação com Amberlite XAD-4 empacotada em coluna no experimento E1.

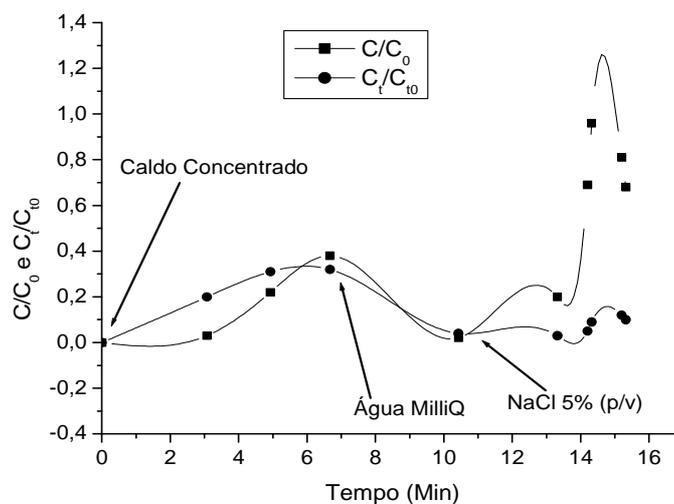


Figura 14: Comportamento da concentração de ácido clavulânico no ensaio E1, na etapa de purificação com a resina IRA-400.

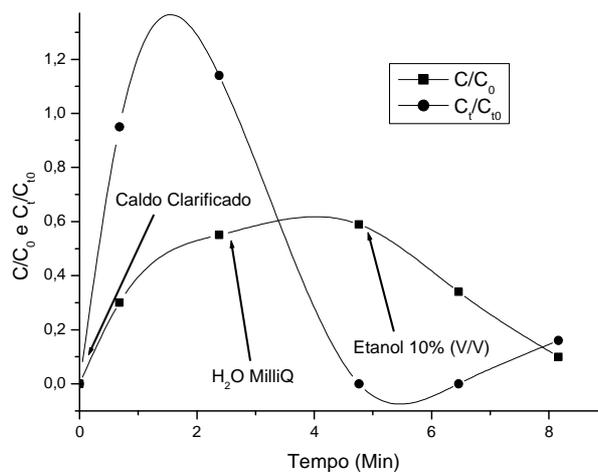


Figura 15: Comportamento da concentração de ácido clavulânico e contaminantes no ensaio E1, na etapa de purificação com a resina XAD-4.

Da observação da Figura 14 pode se avaliar que na etapa de adsorção do AC, ocorreram perdas de AC devido à saturação da coluna. Na Figura 15 o ácido clavulânico não foi adsorvido, o que já era esperado, pois o ácido clavulânico tem uma fraca interação com a superfície apolar dessas resinas (Mayer et al., 1996) e na fase de adsorção foi obtida uma alta purificação do ácido

clavulânico, onde se pode presumir que parte dos contaminantes presentes na solução é adsorvida na resina.

Nos ensaios E2, E3 e E4 foram realizadas as etapas de extração e troca iônica em coluna de leito fixo com a resina Amberlite IRA - 400. A etapa de adsorção com a resina Amberlite XAD-4 não foi realizada devido a dificuldades operacionais do sistema, pois o volume de solução aplicado nesta coluna não era suficiente para uma efetiva análise experimental.

O ensaio E3 foi realizado em coluna com raio de 0,75 cm, altura de 20 cm e vazão de 5,5 mL.min<sup>-1</sup>. Os resultados experimentais obtidos no ensaio E3 estão representados na Tabela 5.9.

Tabela 5.9: Resultados obtidos de fator de concentração, fator de purificação e rendimento para a etapa de extração e as etapas de adsorção, no ensaio E3.

E 3	C <sub>ACi</sub> (mg.L <sup>-1</sup> )	C <sub>ACf</sub> (mg.L <sup>-1</sup> )	CT <sub>i</sub> (-)	CT <sub>f</sub> (-)	FC (-)	FP (-)	Vi (mL)	VF (mL)	R (%)
Extração	191,6	291,9	1,98967	1,11775	1,5	2,7	300	65,0	33,0
IRA – 400	291,9	216,9	1,11775	< 0,00226	0,7		40	2,5	4,6
Global	191,5	216,9	1,98967	< 0,00226	1,1	alto	300	2,5	0,9

O ensaio E4 foi realizado em coluna com raio de 0,75 cm, altura de 22,8 cm e vazão em torno de 5,2 mL.min<sup>-1</sup>. Os resultados experimentais obtidos no ensaio E4 estão representados na Tabela 5.10.

Tabela 5.10: Resultados obtidos de fator de concentração, fator de purificação e rendimento para a etapa de extração e as etapas de adsorção no ensaio E4.

E 4	C <sub>ACi</sub> (mg.L <sup>-1</sup> )	C <sub>ACf</sub> (mg.L <sup>-1</sup> )	CT <sub>i</sub> (-)	CT <sub>f</sub> (-)	FC (-)	FP (-)	Vi (mL)	VF (mL)	R (%)
Extração	161,9	173,6	1,72628	0,35001	1,1	5,3	100	34,0	36,5
IRA – 400	173,6	96,7	0,35001	< 0,00226	0,6	alto	34	2,5	4,1
Global	161,9	96,7	1,72628	< 0,00226	0,6	alto	100	2,5	0,5

Pelos resultados apresentados nas Tabelas 5.7, 5.8, 5.9 e 5.10, pode-se observar que na etapa de adsorção sobre a resina IRA-400, os contaminantes foram separados e se concluir que, de acordo com a convenção, sempre se deve operar a alimentação do leito na condição de  $C/C_0$  de até 0,1.

### 5.3 Extração do ácido clavulânico por n-butanol seguida de adsorção em coluna de leito fixo

Neste item apresentam-se os resultados do estudo da extração do ácido clavulânico, do caldo fermentado, pelo solvente orgânico n-butanol. Nestes experimentos foi avaliada a seqüência das etapas de extração e troca iônica para o processo de extração e purificação respectivamente. Na etapa de adsorção por troca iônica, todo o volume alimentado na a eluição foi coletado na saída da coluna, permitindo o cálculo do rendimento, cujo resultado é mais representativo na análise do processo.

O ensaio F1 foi realizado em coluna com raio de 0,75cm, altura de 22,5cm e vazão em torno de 6,5 mL.min<sup>-1</sup>. Os resultados experimentais obtidos no ensaio F1 estão representados na Tabela 5.11.

Tabela 5.11: Resultados obtidos de fator de concentração e rendimento para as etapas de extração e adsorção no ensaio F1.

F 1	$C_{ACi}$ (mg.L <sup>-1</sup> )	$C_{ACf}$ (mg.L <sup>-1</sup> )	$CT_i$ (-)	$CT_f$ (-)	FC (-)	FP (-)	$V_i$ (mL)	$V_f$ (mL)	R (%)
Extração	171,7	448,6	2,33777	1,13153	2,6	5,4	250	40	41,8
IRA – 400	448,7	139,6	1,13153	0,02733	0,3	12,8	40	40	31,1
Global	171,7	139,6	2,33777	0,02733	0,8	69,3	250	40	13,0

Pelos resultados representados na Tabela 5.11, pode-se observar que os valores para o fator de concentração e purificação para a extração com o n-butanol foi maior em relação ao acetato de etila e o rendimento na etapa de adsorção pela resina IRA-400, foi representando efetivamente o rendimento de uma adsorção por troca iônica.

O ensaio F2 foi realizado em coluna com raio de 0,75 cm, altura de 21,5 cm e vazão de 5,8 mL.min<sup>-1</sup>. Neste ensaio o AC foi eluído com uma solução tampão de Tris –HCl (0,2M) a pH 6,2, com objetivo de manter constante o pH na etapa de dessorção. Os resultados experimentais obtidos no ensaio F2 estão representados na Tabela 5.12.

Tabela 5.12: Resultados obtidos de fator de concentração e rendimento para as etapas de extração e adsorção no ensaio F2.

F 2	C <sub>ACi</sub> (mg.L <sup>-1</sup> )	C <sub>ACf</sub> (mg.L <sup>-1</sup> )	CT <sub>i</sub> (-)	CT <sub>f</sub> (-)	FC (-)	FP (-)	Vi (mL)	Vf (mL)	R (%)
Extração	179,7	511,1			2,8		250	50	56,89
IRA – 400	485,9	0			0		45	45	NC
Global	179,7	0			0		250	40	NC

Pelos resultados do experimento F2 apresentados na Tabela 5.12, concluiu-se que o ácido clavulânico não foi dessorvido. Esse fato ocorreu possivelmente por causa da baixa concentração de íons cloreto no tampão.

O ensaio F3 foi realizado em coluna com raio de 0,75cm, altura de 15,5cm e vazão de 5,6 mL.min<sup>-1</sup>. Neste experimento, a coluna foi eluída com solução tampão de Tris –HCl a pH 6,2 com NaCl a 5% (p/v). Os resultados experimentais obtidos no ensaio F3 estão representados na Tabela 5.13.

Tabela 5.13: Resultados obtidos de fator de concentração, fator de purificação e rendimento para as etapas de extração e adsorção, no ensaio F3.

F 3	C <sub>ACi</sub> (mg.L <sup>-1</sup> )	C <sub>ACf</sub> (mg.L <sup>-1</sup> )	CT <sub>i</sub> (-)	CT <sub>f</sub> (-)	FC (-)	FP (-)	Vi (mL)	Vf (mL)	R (%)
Extração	217,5	493,7	2,30212	1,49330	2,3	3,5	225	50	50,4
IRA – 400	493,7	190,7	1,49330	0,01926	0,4	29,5	50	40	30,8
Global	217,5	190,7	2,30212	0,01926	0,9	104,0	225	40	15,6

Pelos resultados representados na Tabela 5.13, verificou-se que o ácido clavulânico foi desorvido nestas condições do experimento. Esse fato ocorreu por causa do aumento da concentração de íons cloreto no tampão Tris - HCl, promovendo assim a eluição. Durante a etapa de adsorção ocorreu uma perda de ácido clavulânico, que pode ter sido devido à alta concentração de ácido clavulânico alimentada na coluna ultrapassando-se a relação de  $C/Co$  de 0,1, tal como ocorrido no experimento E1.

O ensaio F4 foi realizado em coluna com raio de 0,75 cm, altura de 15 cm e vazão de 5,5 mL.min<sup>-1</sup>. Neste ensaio o AC foi eluído com solução tampão de Tris -HCl (pH 6,2) e NaCl 5% (p/v). Os resultados experimentais obtidos no ensaio F4 estão representados na Tabela 5.14.

Tabela 5.14: Resultados obtidos de fator de concentração e rendimento para as etapas de extração e adsorção no ensaio F4.

F 4	$C_{ACi}$ (mg.L <sup>-1</sup> )	$C_{ACf}$ (mg.L <sup>-1</sup> )	$CT_i$ (-)	$CT_f$ (-)	FC (-)	FP (-)	$V_i$ (mL)	$V_f$ (mL)	R (%)
Extração	225,41	612,57	2,32842	1,49786	2,7	4,2	210	37	47,9
IRA – 400	612,57	225,69	1,49786	traços	0,4	alto	37	37	36,8
Global	225,41	225,69	2,32842	traços	1,00	alto	210	37	17,6

Pelos resultados apresentados nas Tabelas 5.11, 5.13 e 5.14, verificou-se que nos ensaios F3 e F4 os fatores de concentração e rendimento foram maiores que no ensaio F1, onde se utilizou apenas solução de NaCl 5% (m/v), com isso pode-se concluir que a eluição feita com uma solução tampão Tris – HCl a pH 6,2 com NaCl a 5% (p/v) contribuiu com o aumento destes fatores, visto que a eluição foi feita em condições de pH onde se obtém maior estabilidade para o AC.

#### **5.4 Extração do ácido clavulânico em sistemas de duas fases aquosas seguida de adsorção em coluna de leito fixo**

Apresentam-se neste item os resultados dos experimentos realizados com a extração do ácido clavulânico do caldo clarificado, através do sistema de duas fases aquosas, SDFA utilizando uma mistura de Polietileno glicol e tampão fosfato, tal como descrito no item 4.3. Inicialmente, os

experimentos foram realizados a temperatura ambiente e pH 6,2 com o objetivo de minimizar a degradação do produto. Realizou-se a extração do ácido clavulânico seguida de adsorção em coluna de leito fixo para PEG de diferentes pesos moleculares (400, 600 e 4000). As extrações foram realizadas com base nos resultados obtidos por Hirata, (2003). A composição dos sistemas estudados encontra-se apresentada na Tabela 5.15.

Tabela 5.15: Composição dos sistemas para os PEG's 400, 600 e 4000 e pH 6 e 7.

Sistema	PEG	pH	$C_{ACi}$ ( $mg.L^{-1}$ )	Composição	$V_{PEG}$ (mL)	$V_{Fosfato}$ (mL)	$V_i$ (mL)
A1	400	7	175,4	21% PEG + 23,6% fosf.	50,0	35,0	70,0
A2	600	6	159,3	21% PEG + 17,7% fosf.	40,0	40,0	64,0
B2	600	6	159,6	21% PEG + 17,7% fosf.	45,0	35,0	68,0
B3	4000	6	177,5	15% PEG + 15% fosf.	14,0	29,0	37,5
A4	4000	7	161,0	15% PEG + 20% fosf.	15,0	55,0	55,0
B4	4000	7	155,8	15% PEG + 20% fosf.	15,0	60,0	70,0

Na tabela 5.16 estão representados os resultados obtidos para a concentração de ácido clavulânico nas fases PEG e fosfato e seus respectivos coeficientes de partição, fator de concentração, fator de purificação, rendimento e perdas, e a composição dos sistemas estão apresentados na Tabela 5.15.

Tabela 5.16: Resultados obtidos para os sistemas (PEG-fosfato) estudados.

Sistemas	$C_{AC}$ – Fase PEG ( $mg.L^{-1}$ )	$C_{AC}$ – Fase Fosf. (mg/L)	$CT_i$ (-)	$CT_f$ (-)	$K_p$ (-)	FC (-)	FP (-)	R (%)	P (%)
A1	206,1	35,6	2,43155	2,57758	5,78	1,2	1,1	83,9	16,1
A2	203,7	14,1	1,28024	1,75836	14,47	1,3	0,9	79,9	20,6
B2	205,3	40,8	2,06422	2,66124	5,02	1,3	1,0	85,1	14,9
B3	238,4	109,1	2,43530	2,67925	2,18	1,3	1,1	50,1	49,9
A4	330,2	52,7	1,31689	1,85400	6,25	2,0	1,5	55,9	44,1
B4	353,8	80,7	3,94226	4,95731	4,38	2,3	1,8	61,8	38,2

Pelos resultados apresentados na Tabela 5.16 é possível verificar que os maiores valores de rendimento, foram obtidos nos experimentos A1, A2 e B2, com isso pode-se concluir que o rendimento é maior com PEG de baixo peso molecular. Embora os melhores resultados de fator de purificação e fator de concentração tenham sido obtidos com o PEG de maior peso molecular. Ressalta-se que para a estimativa do FC, FP e Rendimento, são considerados que todo o AC extraído para a fase PEG seja, numa etapa de re-extração, recuperado. Assim, pode-se estar superestimando os valores de FC bem como subestimando os valores de FP, tendo em vista a possibilidade de que a re-extração possa ser mais seletiva.

Após a etapa de extração do ácido clavulânico em sistema de duas fases aquosas buscou-se estudar a separação do AC do PEG. Inicialmente examinou-se a possibilidade de se realizar a adsorção em coluna de leito fixo, para recuperar o AC extraído ou para adsorver parte do PEG.

Foram realizados experimentos com os PEG de menores pesos moleculares, sendo de 400 e 600, e como sólido adsorvente foram utilizadas resinas Amberlite IRA-400 de troca iônica e a hidrofóbica Amberlite XAD-4.

A Figura 16 apresenta a concentração de AC e contaminantes, durante a percolação, lavagem e eluição para a alimentação com uma solução de AC extraído em solução PEG 400, na coluna recheada com a resina Amberlite XAD-4.

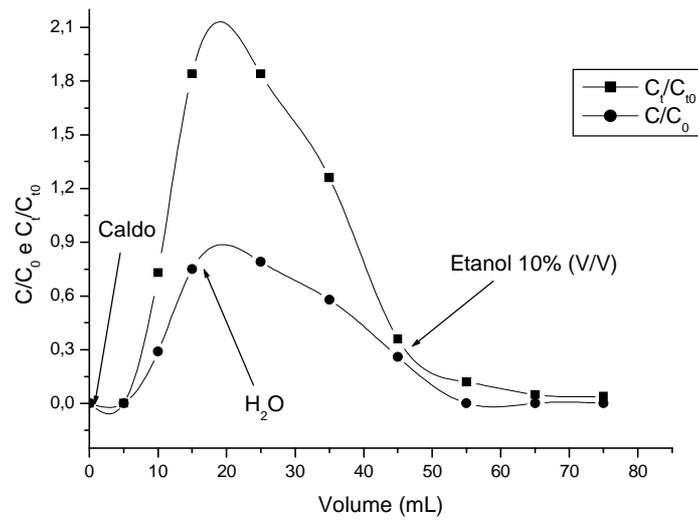


Figura 16: Comportamento da concentração de ácido clavulânico e contaminantes, na etapa de purificação com a resina XAD-4.

A Figura 17 apresenta a concentração de AC e contaminantes durante a percolação, lavagem e eluição da alimentação de uma solução PEG 600 e AC em coluna empacotada com a resina Amberlite IRA-400.

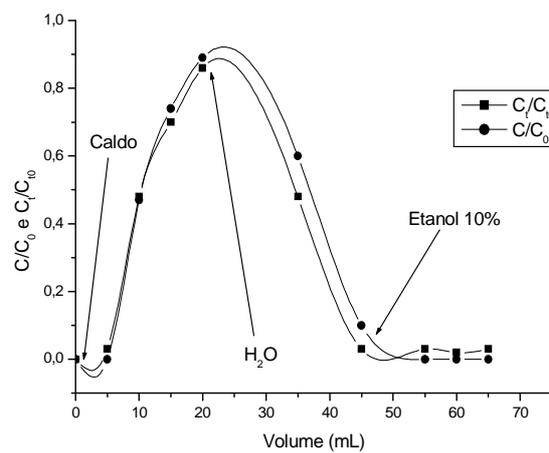


Figura 17: Comportamento da concentração de ácido clavulânico e contaminantes, na etapa de purificação com a resina IRA-400.

A Figura 18 apresenta a concentração de AC e contaminantes durante a alimentação, lavagem e eluição de uma solução de PEG 600 e AC feita passar em uma coluna recheada com a resina Amberlite IRA-400.

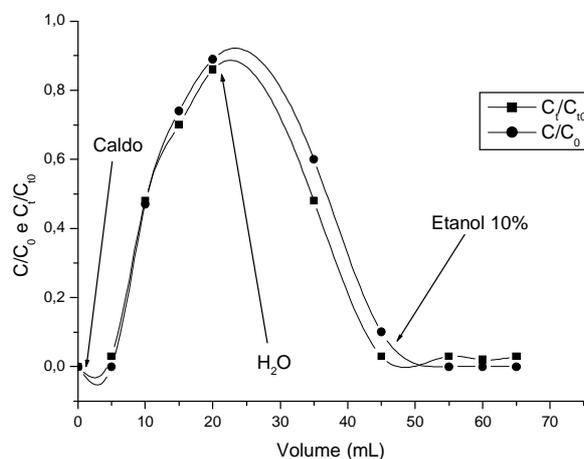


Figura 18: Comportamento da concentração de ácido clavulânico e contaminantes, na etapa de purificação com a resina IRA-600.

Nestes experimentos verificou-se não ser possível separar o AC do PEG. No caso dos experimentos realizados com a troca iônica, presume-se que na solução a concentração de íons fosfato não permitiu que ocorresse a troca iônica dos íons presentes nos sítios da resina com os íons de AC. No experimento com a resina XAD-4 não foi possível realizar a adsorção do PEG.

### 5.5 Comparação de dois métodos de extração líquido-líquido.

Neste item apresentam-se os resultados onde se comparam os valores de fator de concentração, fator de purificação e rendimento para a extração por solvente orgânico e extração em sistema de duas fases aquosas.

Na Tabela 5.17 estão representados os resultados obtidos de fator de concentração, fator de purificação e rendimento para os experimentos de extração pelos solventes orgânicos acetato de etila e n-butanol e extração em sistemas de duas fases aquosas (PEG – Fosfato).

Tabela 5.17: Resultados obtidos de fator de concentração, fator de purificação e rendimento do ácido clavulânico.

Experimentos	FC (-)	FP (-)	R (%)
E1	1,9	3,1	25,5
E2	1,0	2,4	35,0
E3	1,5	2,7	33,0
E4	1,1	5,3	36,5
F1	2,6	5,4	41,8
F2	2,8	ND	56,9
F3	2,3	3,5	50,4
F4	2,7	4,2	47,9
A1	1,2	1,1	83,9
A2	1,3	0,9	79,9
B2	1,3	1,0	85,1
B3	1,3	1,1	50,1
A4	2,1	1,5	55,9
B4	2,3	1,8	61,8

*ND: não determinado*

Na Tabela 5.17 pode-se verificar que na extração SDFA foi possível obter os melhores resultados quanto ao rendimento. Deve-se salientar que não foi realizadas a etapa de re-extração do ácido clavulânico do PEG, com isso valor de rendimento pode ser maior ou menor do que o calculado, dependendo da técnica e eficiência da re-extração a ser utilizada. Para a extração com os solventes orgânicos os melhores resultados de fator de concentração, fator de purificação e rendimento foi para o n-butanol.

## 5.6 Simulação de um extrator contra-corrente

Neste item são apresentados resultados obtidos para simulação de um extrator contra-corrente com o objetivo de determinar o número de estágios necessários. Com o coeficiente de partição do n-butanol obtido experimentalmente, foi possível, através do modelo matemático proposto, obter a concentração final de AC nas fases orgânica e aquosa, perdas e rendimento para os diferentes tempos de residência. Note-se que a influência do tempo de residência é estudada nos casos onde considerou-se a degradação do AC na fase aquosa. Nas situações onde não se levou em consideração a degradação foi apenas avaliado o número de extratores necessários para a completa extração.

Os dados de entrada utilizados para a simulação do extrator considerando a degradação do AC na fase aquosa, foram:

- Concentração inicial de AC na fase aquosa =  $100 \text{ mg.L}^{-1}$ .
- Concentração inicial de AC na fase orgânica = zero.
- Volume dos extratores = 100 L.
- $K_p$  para o n-butanol igual a 1,3, obtido experimentalmente em pH 2 e temperatura ambiente.
- $k_d = 0.0044725 \text{ min}^{-1}$  (Bersanetti, et all, 2005).
- Tempo de residência ( $\tau$ ) = 1 ,2 ,5 ,7 ,10 e 20 min.

Os dados de entrada utilizados para fazer a simulação do extrator sem considerar a degradação do AC na fase aquosa foram:

- Concentração inicial de AC na fase aquosa =  $100 \text{ mg.L}^{-1}$ .
- Concentração inicial de AC na fase orgânica = zero.
- Volume do extrator = 100L.
- $K_p$  para o n-butanol igual a 1,3, obtido experimentalmente.

Na Tabela 5.18 estão representados os resultados obtidos de concentração de ácido clavulânico na fase orgânica, através da simulação de um extrator contra-corrente. Os resultados obtidos para a concentração final de ácido clavulânico na fase aquosa nos diferentes tempos de residência e concentração final de AC sem considerar a degradação, estão no Apêndice B.

Tabela 5.18: Resultados obtidos para a concentração final de ácido clavulânico na fase orgânica nos diferentes tempos de residência e concentração final de AC sem considerar a degradação.

Nº de extratores	$\tau = 1\text{min}$	$\tau = 2\text{min}$	$\tau = 5\text{min}$	$\tau = 7\text{min}$	$\tau = 10\text{min}$	$\tau = 20\text{min}$	Sem considerar degradação
2	74,8	74,6	74,3	74,1	73,7	72,6	74,0
3	83,6	83,4	82,9	82,5	82,0	80,3	83,8
4	88,6	88,4	87,2	87,2	86,5	84,3	88,9
5	91,8	91,5	90,6	90,7	89,2	86,5	92,2
6	93,9	93,5	92,5	91,8	90,9	87,9	94,3
7	95,3	94,9	93,8	93,0	91,9	88,6	95,8
8	96,4	95,9	94,6	93,8	92,6	89,1	96,8
10	97,6	97,1	95,7	94,7	93,4	89,6	98,2

Com os resultados da Tabela 5.18 e com dados de entrada utilizados para realizar a simulação do extrator foi possível calcular o rendimento para os diferentes tempos de residência, conforme equação 4.3. A Figura 19 ilustra esses resultados.

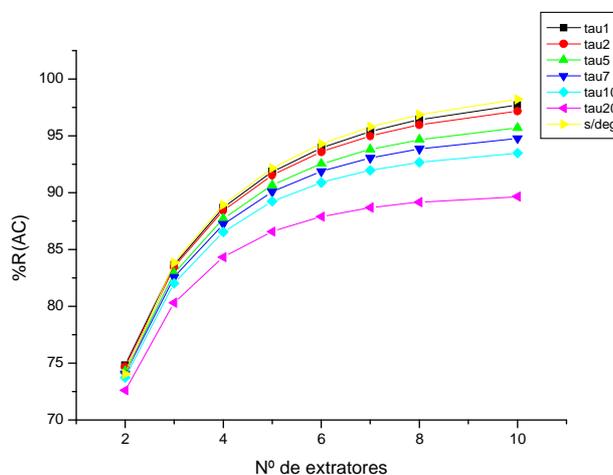


Figura 19: Comparação do rendimento de AC simulados para os vários tempos de residência.

Para cada uma das situações puderam ser calculadas as perdas no processo, conforme equação 4.4, que representa a concentração de ácido clavulânico que ficou na fase aquosa e mais a concentração de ácido clavulânico que degradou durante a extração. Estes resultados estão apresentados na Tabela 5.19.

Tabela 5.19: Resultados obtidos para as perdas de AC (diferentes tempos de residência)

Nº de extratores	$\tau =$ 1min	$\tau =$ 2min	$\tau =$ 5min	$\tau =$ 7min	$\tau =$ 10min	$\tau =$ 20min
2	25,2	25,4	25,7	25,9	26,3	27,4
3	16,4	16,6	17,1	17,5	18,0	19,7
4	11,4	11,6	12,8	12,8	13,5	15,7
5	8,2	8,5	9,4	9,3	10,8	13,5
6	6,1	6,5	7,5	8,2	9,1	12,1
7	4,7	5,1	6,2	7,0	8,1	11,4
8	3,6	4,1	5,4	6,2	7,4	10,9
10	2,4	2,9	4,3	5,3	6,6	10,4

Estes resultados encontram-se ilustrados na Figura 20.

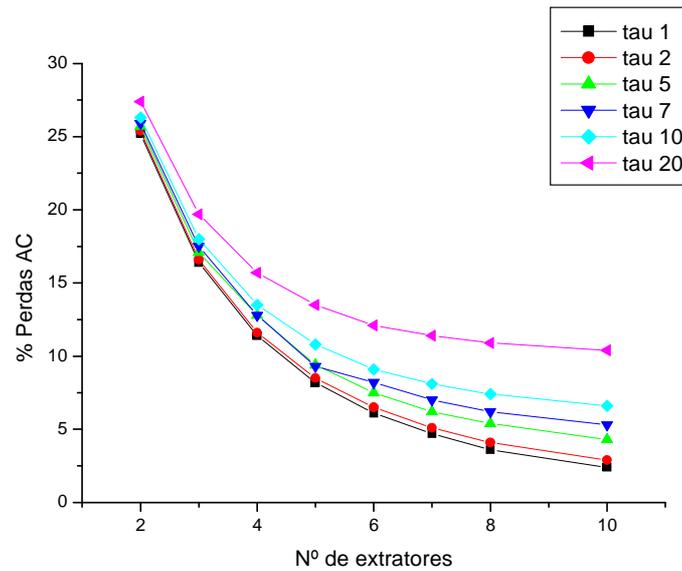


Figura 20: Comparação dos perfis de perdas de AC simulados.

Fica evidente que quanto maior o tempo de residência menor o rendimento em ácido clavulânico e maior as perdas, que pode ser observado nas Figuras 19 e 20. Quanto ao número de extratores a mesma conclusão pode ser obtida observando-se os resultados apresentados nas Tabelas 5.18 e 5.19 bem como a ilustração destes resultados nas Figuras 19 e 20.

Observando-se os resultados da simulação, pode-se concluir que a partir do quinto extrator e do tempo de residência de 5 minutos não é mais viável extrair, pois aumenta a degradação do ácido clavulânico na fase aquosa.

## 6. CONCLUSÕES

Dos resultados obtidos nos experimentos de extração e purificação pode-se concluir que a seqüência proposta para a extração e purificação é viável. Têm-se ainda , as seguintes conclusões específicas que podem ser apresentadas:

- O pH ótimo para extração é 2,0;
- O melhor solvente orgânico para a extração é o n-butanol com o coeficiente de partição,  $K_p$ , de 1,3;
- Para a extração com o n-butanol, os rendimentos foram entre 41,80 e 56,89 e fatores de concentração entre 2,27 e 2,82;
- Na etapa de adsorção em coluna de leito fixo com a resina Amberlite IRA-400, após a extração com n-butanol, os rendimentos foram entre 30,8 e 36,8 e fatores de purificação altos;
- A adsorção com a resina Amberlite XAD-4, realizada apenas no experimento E1, embora não tendo sido realizada nos próximos experimentos, devido às dificuldades operacionais, mostrou aumentar a purificação da solução;
- Para as extrações em SDFA, PEG de menor peso molecular foi o que forneceu maiores rendimentos e para valores de pH = 7 as maiores perdas;
- Nas etapas de extração em sistemas de duas fases aquosas seguidas de adsorção em coluna de leito fixo empacotada com a resina Amberlite IRA-400 e com a resina Amberlite XAD-4, não foi possível separar o AC do PEG;
- Quanto à simulação do extrator contra corrente, o maior rendimento de AC obtido foi de 98,22% sem degradação na fase aquosa e os resultados com degradação nos diferentes tempos de residência simulados a partir do quinto extrator a concentração do ácido clavulânico na fase orgânica permanece constante, não sendo mais viável.

## 7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Tendo em vista os resultados obtidos e as conclusões geradas a partir destes resultados, algumas sugestões ainda podem ser apresentadas.

Para o processo como um todo:

- Avaliar a alteração da ordem proposta, como primeiro realizar a adsorção por troca iônica e na seqüência realizar a extração com solventes orgânicos e S DFA.

Para as partes específicas:

- Estudar as extrações com solventes orgânicos realizando-se as partições através da saturação da fase aquosa com sais;
- Estudar o efeito da temperatura e tempo de contato na extração;
- Estudar a re-extração do ácido clavulânico do PEG;
- Estudar a cinética de degradação do AC na fase PEG;
- Estudar outros eluentes para a troca iônica;
- Estudar outros trocadores de íons para a adsorção do AC;
- Estudar a nanofiltração como possível substituta de uma das etapas apresentadas neste trabalho;
- Realizar simulações com diferentes volumes buscando maximizar o rendimento e minimizando as perdas.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERTSSON, P.A. Partitioning of cell particles and macromolecules.- 3.ed.New York, John Wiley & Sons, 345p., 1986.

ASENJO, J.A. Separations for biotechnology- vol. II, Ed. D.L. Pyle, Londres, 1990.

BARBOZA, M.; HOKKA, C.O.; MAUGERI, F. Purificação de Cefalosporina C em Coluna de Leito Fixo Utilizando Adsorvente Polimérico Não Iônico. Anais do XIII SINAFERM (Simpósio Nacional de Fermentações), Teresópolis, RJ, Brasil, 45.1-45.6, 2000.

BELTER, P. A. Ion Exchange Recovery of Antibiotics. In: Moo-Young M ed. Comprehensive Biotechnology, v. 2, p.473-480, Pergamon Press, New York, 1985.

BELTER, P.A; CUSSLER, E.L., HU, WEI-SHOU The chemistry of extraction. Bioseparations- Downstream Processing for Biotechnology, p.100-103, John-Wiley & Sons, 1988.

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

BLANCH, H.W.; CLARK, D.S. Biochemical Engineering- cap.6, 1997.

BROWN, A. G.; BUTTERWORTH, D.; COLE, M.; HANSCOMB, G.; HOOD, J. D.; READING, C.; ROLINSON, G. N. Naturally Occurring  $\beta$ -Lactam Inhibitors with Antibacterial Activity. The Journal of Antibiotics, v. 29, n. 6, p. 668-669, 1976.

- BUTTERWORTH, D. Clavulanic Acid: Properties, Biosynthesis and Fermentation. In: Vandamme, E. J. Biotechnology of Industrial Antibiotics- New York, Marcel Dekker. V.22, p.225-235, 1984.
- CASS, Q. B.; DEGANI, A. L. G. Desenvolvimento de Métodos por HPLC Fundamentos, Estratégias e Validação. Série Apontamentos, p. 5, EdUFSCAR, 2001.
- COLLINS. C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. Introdução a Métodos Cromatográficos. Editora Unicamp, Campinas,1995.
- COLE, M.; HOWARTH, T.T.; READING, C. Process of Production of Clavulanic Acid. US Patent 4110165,1978.
- CRUEGUER, W. & CRUEGUER, A. Biotechnology: A Textbook of Industrial Microbiology, Sunderland, Sinauer Associates Inc., 1984,Cap 13.
- ECKERS, C.; CHALKLEY, R.; HASKINS, N.; EDWARDS, J.; GRIFFIN, J.; ELSON, S. Investigation into the Use of Derivatization with Imidazole for the Detection of Clavam Compounds by Liquid Chromatography-Mass Spectrometry. Analytical Communications, v. 33, p. 215-218, 1996.
- FLORENT, J.J. Biotechnology: microbial products II- v.4, cap.5, H Pape and H.-J. Rehn. Ed. VCH, 1986.
- FONSECA, A.L. Antibióticos na clinica diária- segunda edição Epume, RJ, 1974.

FOULSTONE, M.; READING, C. Assay of Amoxicilin and Clavulanic Acid, the Components of Augmentin, in Biological Fluids with High-Performance Liquid Chromatography. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, p. 753-762, 1982.

GOUVEIA, E. R.; BAPTISTA-NETO, A.; AZEVEDO, A.G.; BADINO-JR, A.C.; HOKKA, C.O.; Improvement of Clavulanic Acid Production by *Strptomyces Clavuligerus* in Medium Containing Soybean Derivatives. World Journal of Microbiology & Biotechology, v.15, p.623-627, 1999.

HOWART, T.T.; BROWN, A.G.; KING, T.J. Clavulanic acid, a novel  $\beta$ -lactam isolated from *Streptomyces clavulygerus*; X- ray crystal structure analysis. JCS. Chem. Commum; p. 266 – 267, 1976.

HIRATA, D.B. Produção de ácido clavulânico em batelada alimentada por *Streptomyces clavuligerus* e extração em sistema de duas fases aquosas.UFSCar - São Carlos, 2003.

KILIKIAN, D.V.; BASTAZIN, M.R.; MINAMI, N.M.; GONÇALVES, E.M.R.; JUNIOR, A.P. Liquid-liquid extraction by reversed micelles in biotechnological process. Brazilian Journal of Chemical Engineering, v.17, p.29-38, 2000.

LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. Biotecnologia Industrial- V1 Fundamentos, V3 Processos Fermentativos e Enzimáticos. 1ed. Editora: Edgard Blucher Ltda, 2001.

MAYER, A. F.; ANSPACH, F.B. & DECKWER, W. D. Purification os clavulanic acid ion-pairing systems Bioseparation., v.6, p.25-39, 1996.

MAYER, A. F.; DECKWER, W. D. Simultaneous Production and Decomposition of Clavulanic Acid during *Streptomyces clavuligerus* Cultivation. Appl. Microbiol. Biotechnol., v.45, p.41-46, 1996.

MAYER, A. F.; HARTMANN R.; DECKWER, W. D. Diffusivities of Clavulanic Acid in Porous Sorption Systems with Ion-Pairing. Chemical Engineering Science, v.52, n. 24, p.4561-4568, 1997.

MINAMI, N.M. Extração líquido-líquido aplicada à separação e purificação da amilglicosidade. São Paulo, 1997. 190p. Dissertação (mestrado-USP).

NABAIS, A. M. A.; CARDOSO, J. P. Ultrafiltration of Fermented Broths and Solvent Extraction of Antibiotics. Bioprocess Engineering, v.13, p. 215-221, 1995.

OSELKA, G. W.; LEVI, G. C.; LOPES, H. V.; MENDONÇA, J.S.; BALDY, J.L.S.; TRABULSI, L.R.; NETO, V. A. Antibióticos na Prática Médica, Editora Gremed Ltda,1978.

READING, C.; COLE, M. Clavulanic Acid: a Beta-Lactamase-Inhibiting Beta -Lactam from *Streptomyces clavuligerus*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, p. 852-857, V. 11, No5, 1977.

SIMON, R. Clavulanic Acid Extraction Process. US Patent 6172221, 2001.

THE MATH WORKS, Inc. (1998). User's Guide.

VIEIRA, C.M. ; BADINO-JR, AC. Estudos Preliminares do Processo de Extração de Ácido Clavulânico por Solvente Utilizando N-Butanol. COBEQ (Congresso Brasileiro de Engenharia Química) RJ, 2003.

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. v.668, p.237-240, 1994.

VOGEL, H.C. Solvent Extraction. Fermentation and Biochemical Engineering Handbook- p. 175-177, Noyes Publications, 1983.

WEST, R.C.; ASTLE, M.J.; BEYER, W.H. Handbook of Chemistry and Physics. Chemical Rubber Company Press, 64<sup>th</sup>, 1984.

## APÊNDICE A

### 1) MODELO SEM CONSIDERAR DEGRADAÇÃO DO ÁCIDO CLAVULÂNICO

Entradas

$n=10$ ; número de extratores.

$FA_0=100$

$FS_0=100$

$K_{p1}=1.3$ ;

$CS_0= 0$ ;

$CA(n)= 100$ ;

$FA(1:n)=FA_0$ ;

$FS(1:n)=FS_0$ ;

$K_p(1:n)=K_{p1}$ ;

Extrator 1

$A(1,1)=FA_0$ ;  $A(1,2)=-FA(1)$ ;  $A(1,3:n)=0$ ;  $A(1,n+1)=FS(1)$ ;  $A(1,n+2:2*n)=0$ ;

$B(1,1)=FS_0*CS_0$ ;

$A(n+1,1)=1$ ;  $A(n+1,2:n)=0$ ;  $A(n+1,n+1)=-1/K_{p1}$ ;  $A(n+1,n+2:2*n)=0$ ;

$B(n+1,1)=0$ ;

Extratores intermediários

for  $p=2:n-1$

$A(p,p)=-FA(p-1)$ ;  $A(p,p+1)=FA(p)$ ;  $A(p,n+p-1)=FS(p-1)$ ;  $A(p,n+p)=-FS(p)$ ;

$B(p,1)=0$ ;

$A(n+p,p)=1$ ;  $A(n+p,n+p)=-1/K_p(p)$ ;

$B(n+p,1)=0$ ;

end

Último extrator

$A(n, n) = -FA(n-1)$ ;  $A(n, 2*n-1) = FS(n-1)$ ;  $A(n, 2*n) = -FS(n)$ ;

$B(n, 1) = -FA(n)*CA(n)$ ;

$A(2*n, n) = 1$ ;  $A(2*n, 2*n) = -1/Kp(n)$ ;

$B(2*n, 1) = 0$ ;

$x = A \setminus B$ ;

$CA(1:n+1) = [x(1:n); CA(n)]$ ;

$CS(1:n+1) = [CS0; x(n+1:2*n)]$ ;

## 2) MODELO CONSIDERANDO DEGRADAÇÃO DO ÁCIDO CLAVULÂNICO

Entradas

Tempo de residência

$TauS0 = 5.0$ ; (min)

$TauA0 = 5.0$ ;

$n = 10$  numero de extratores

$Kd = 0.26835/60$ ; (min)<sup>-1</sup>

Volume de cada extrator

for  $i = 1:n$

$VA(i) = 100$ ;

end

$FA0 = VA(1)/TauA0$ ; (L/min)

$FS0 = VA(1)/TauS0$ ; (L/min)

$Kp1 = 1.3$ ;

$CS0 = 0$ ;

$CA(n) = 100$ ;

FA (1:n)=FA0;

FS (1:n)=FS0;

Kp (1:n)=Kp1;

Extrator 1

A (1,1) =-(FA0/VA (1)+Kd\*0.5); A(1,2)=FA(1)/VA(1); A(1,3:n)=0;

A (1, n+1) =-FS (1)/VA(1); A(1,n+2:2\*n)=0;

B(1,1) =-FS0\*CS0/VA (1);

A (n+1,1) =1; A (n+1,2:n)=0; A(n+1,n+1)=-1/Kp1; A(n+1,n+2:2\*n)=0;

B(n+1,1) =0;

Extratores intermediários

for p=2:n-1

A (p,p)=-((FA(p-1)/VA(p)+Kd\*0.5)); A(p,p+1)=FA(p)/VA(p);

A (p,n+p-1)=FS(p-1)/VA(p); A(p,n+p)=-FS(p)/VA(p);

B(p,1)=0;

A (n+p,p)=1; A(n+p,n+p)=-1/Kp(p);

B(n+p,1)=0;

end

Ultimo extrator

A (n, n) =-(FA (n-1)/VA(n)+Kd\*0.5); A(n,2\*n-1)=FS(n-1)/VA(n);

A (n, 2\*n) =-FS(n) /VA(n);

B(n, 1) =-FA(n)\*CA(n)/VA(n);

A (2\*n, n )=FA (n-1); A(2\*n,2\*n)=-FS(n)/Kp(n);

B(2\*n, 1 )=0;

$x=A\setminus B;$

$CA(1:n+1)=[x(1:n); CA(n)]/2;$

$CS(1:n+1)=[CS0; x(n+1:2*n)];$

## APÊNDICE B

Tabela 20: Resultados obtidos para a concentração final de ácido clavulânico na fase aquosa nos diferentes tempos de residência e concentração final de AC sem considerar a degradação.

Nº de extratores	$\tau =$ 1min	$\tau =$ 2min	$\tau =$ 5min	$\tau =$ 7min	$\tau =$ 10min	$\tau =$ 20min	Sem considerar degradação
2	12,49	12,46	12,37	12,30	12,21	11,91	25,06
3	8,04	8,00	7,89	7,81	7,70	7,35	16,16
4	5,48	5,44	5,32	5,24	5,13	4,77	11,05
5	3,87	3,83	3,71	3,63	3,52	3,17	7,83
6	2,80	2,76	2,64	2,56	2,46	2,14	5,68
7	2,05	2,01	1,90	1,83	1,74	1,46	4,19
8	1,52	1,48	1,38	1,32	1,24	1,00	3,12
10	0,85	0,82	0,74	0,70	0,64	0,47	1,77