



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

**PURIFICAÇÃO DE PENICILINA G POR ADSORÇÃO
EM RESINAS HIDROFÓBICAS**

ANDRÉ NOGUEIRA CASTRO DE BARROS

**SÃO CARLOS – SP - BRASIL
AGOSTO DE 2008**

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

**PURIFICAÇÃO DE PENICILINA G POR ADSORÇÃO
EM RESINAS HIDROFÓBICAS**

ANDRÉ NOGUEIRA CASTRO DE BARROS

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de São Carlos como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Engenharia Química.

**SÃO CARLOS – SP - BRASIL
AGOSTO DE 2008**

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

B277pp

Barros, André Nogueira Castro de.
Purificação de penicilina G por adsorção em resinas hidrofóbicas / André Nogueira Castro de Barros. -- São Carlos : UFSCar, 2008.
80 f.

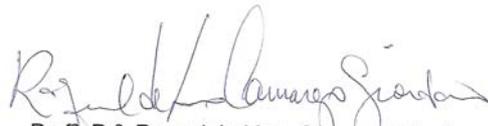
Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2008.

1. Penicilina. 2. Adsorção. 3. Resinas hidrofóbicas. I.
Título.

CDD: 660.28423 (20^a)

MEMBROS DA BANCA EXAMINADORA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE
ANDRÉ NOGUEIRA CASTRO DE BARROS APRESENTADA AO PROGRAMA DE
PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL
DE SÃO CARLOS, EM 06 DE AGOSTO DE 2008.

BANCA EXAMINADORA:



Prof^a. Dr^a. Raquel de Lima Camargo Giordano
Orientador, PPG-EQ/UFSCar



Prof. Dr. Roberto Fernandez-Lafuente
ICP-CSIC-Madri/Espanha



Prof. Dr. Paulo Waldir Tardioli
DEQ/UEM



*Dedico este trabalho aos meus pais, Idevar e Cecília,
e às minhas irmãs, que em mais uma etapa de minha
vida estiveram presentes, incentivando-me a
continuar caminhando*

“A penicilina cura os homens, mas é o vinho que os torna felizes.” (Fleming)

“A felicidade não está no fim da jornada, e sim em cada curva do caminho que percorremos para encontrá-la.” (Autor Desconhecido)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus por ter me dado a oportunidade de estar no mundo.

Aos meus pais, Idevar e Cecília, às minhas irmãs, Lili e Ju e à toda minha família, agradeço todo o amor, carinho, compreensão e respeito.

Aos amigos da UFSCar, que me "aturaram" todos os dias, muitas das pessoas que passaram e passam pelo que eu passei e passo: ficar longe da família em busca de um ideal comum.

Meus agradecimentos especiais:

À minha orientadora, professora Dra. Raquel de Lima Camargo Giordano, pela orientação, insistência e por ter confiado em meu trabalho;

À Dasciana de Sousa Rodrigues, a Dasci, pela alegre e divertida convivência no laboratório, pelas valiosas conversas e sugestões que foram essenciais para o desenvolvimento deste trabalho;

À Bruna pela amizade, companheirismo, pelas festas e momentos de descontração durante os 7 anos que estive presente em São Carlos. À Aline, pela amizade e por todos os momentos de apoio que juntos precisamos para a realização desse trabalho. À Carol, pelos divertidos momentos nos corredores do DEQ e na academia. À Débora, pelos momentos de conversa, discussões e entendimentos. Ao Edson, pelas conversas online e pela divertida risada. Ao Adilson, pela paciência diária na hora do almoço;

A todos os amigos de laboratório, Wellington, Geisa, Bia, Thiago, Adriano, Danielle, Andrea, pelos conselhos técnicos, pelo apoio, pela amizade e pelos momentos de descontração que deixaram o ambiente de trabalho mais agradável. A todos os amigos da pós-graduação, Mônica, Ana Maria, Anny, Silvia, Luana, Ivana, Letícia e Sandra, pelo apoio e pela amizade;

A todos os amigos de São Carlos, Karime, Carmen, Luana, Koki, Marina, Ricardo, Luciano e Guilherme, pelo convívio, pela paciência, pelo apoio e pela amizade;

A Ju Lessa pelas dicas experimentais, pela eterna amizade, pelos momentos de desabafo. Ao Bruno pela disposição sempre que precisava de um amigo. Ao Wagner pelo convívio, pelo apoio, pela compreensão e pela amizade. A Mariana, Carla e Alexandre, pela sinceridade de uma amizade, onde vimos que a distância não é suficiente para separar os amigos.

Tenho muito a agradecer e a muitas pessoas que me auxiliaram até onde já cheguei. A todos que colaboraram direta ou indiretamente para a concretização deste trabalho.

Para vocês, ofereço estas páginas...

Muito obrigado a todos!

À FAPESP pela bolsa concedida.

À CNPq e FINEP pelo apoio financeiro.

À PRODOTTI S/A pelo apoio financeiro e incentivo à pesquisa.

À Fundação de Culturas Tropicais pela doação do *Penicillium*.

RESUMO

A separação de produto biotecnológico é uma área de grande importância econômica, pois representa parcela predominante no custo do produto. Na produção industrial de penicilina G (penG), a separação do antibiótico vem sendo feita por extração em solvente orgânico. Contudo, a diminuição no uso desses solventes vem se tornando imperativa em muitos processos químicos, devido a questões ambientais, o que vem motivando a empresa farmacêutica PRODOTTI S/A, produtora de penG, a buscar rotas menos agressivas ao ambiente. Adsorção é uma das operações de concentração/purificação mais utilizadas na indústria química e é baseada na atração exercida sobre o produto (fase líquida) por uma fase sólida. Projeto conjunto UFSCar/Prodotti/FINEP, em andamento, visa estudar, entre outros objetivos, a viabilidade técnica da substituição da extração com solvente pela adsorção de penG em resinas hidrofóbicas. Sendo um ácido fraco, a adsorção de penG é favorecida em baixos valores de pH. Entretanto, a penG pode se degradar nesses valores de pH, sendo necessário, portanto, se buscar condições adequadas de operação.

Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a influência do pH e da temperatura na eficiência de adsorção da penG em resinas hidrofóbicas, buscando condições de máxima eficiência mas que não acarretem sua degradação. Foi necessário inicialmente desenvolver metodologia de análise que permitisse quantificação de grande número de amostras de penG no meio de cultivo, ou seja, na presença de outros nutrientes, bem como discriminasse entre a forma preservada e a degradada. Foram comparados os métodos de CLAE, iodométrico e bioensaio, concluindo-se que CLAE era preciso e quantificava também a degradação, o que permitiu realizar estudos de estabilidade de penG a diferentes valores de pH e temperaturas. Esse método permitiu determinar o tempo máximo em que o antibiótico não degradava em cada condição, bem como o tempo de cultivo e, portanto, que a variação nas concentrações presentes no meio não afetavam a quantificação de penG. Contudo, CLAE é um método caro para estudo envolvendo grande número de amostras provenientes de caldo de cultivo. Desenvolveu-se assim nova metodologia baseada na hidrólise completa da penicilina G, catalisada por penicilina G acilase, que se mostrou precisa, reprodutível e foi por isso utilizada nas etapas seguintes deste trabalho. Avaliou-se a seguir a eficiência de adsorção de pen G das resinas XAD-4, XAD-7, XAD-761 e carvão ativado, verificando-se que XAD-4 era a mais eficiente, com pequena aumento de eficiência a pH 4,0 (44%) quando comparada com pH 6,0 (36%). Para a resina

selecionada, XAD-4, foi então investigada as cinéticas de adsorção e determinadas as isotermas de equilíbrio a diferentes valores de pH e temperaturas. A isoterma de Langmuir foi a que melhor se ajustou aos dados experimentais em todas as condições, obtendo-se máximo valor de q_{\max} de $595,06 \pm 51,54$ mg penG/g resina, a pH 4 e 4 °C.

Visando estudar a adsorção a valores de pH menores que 4,0 e evitar a degradação de penG que ocorre quando presente a altas concentrações e valores de pH abaixo de 4,0, estudaram-se duas estratégias de adsorção. Na primeira, o pH do caldo de cultivo foi ajustado e em seguida este foi mantido em contato com o adsorvente. Na segunda estratégia, o adsorvente foi adicionado ao caldo de cultivo a pH 7 e ao longo da adsorção este pH foi reduzido até ser atingida completa adsorção de penG. O processo com gradiente e adição gradativa de resina mostrou eficiência de adsorção de 0,77g penG/g resina e produtividade de 0,31 g penG/g resina/hora, a pH 4,0, enquanto que adsorção direta a pH 4,0 levou a 0,548g penG/g resina (0,548 g penG/g resina/hora). A estratégia em gradiente, pois, aumenta a eficiência e diminui a produtividade do processo. Os resultados mostraram que o ideal seria trabalhar diretamente a valores de pH ainda menores que 4, mas concentrações elevadas de pen G levam à degradação do antibiótico nessa faixa de pH. A dessorção de penG foi estudada utilizando a técnica de planejamento experimental e investigou-se as variáveis pH, temperatura e composição de mistura água/etanol. Os resultados mostraram que para se obter uma máxima dessorção, o processo deve ser realizado a 8°C e utilizar como eluente uma mistura de 82,5 % etanol e 17,5 % água em pH 6,2.

ABSTRACT

The separation of biotechnological products is an area of great economic importance once it represents the majority of the cost of this product. On industrial production of penicillin G (penG), the separation of the antibiotic has been made by extraction on organic solvent. However the decrease on the use of these solvents has become imperative in many chemical processes, caused mainly by environmental issues, which has motivating the pharmaceutical company PRODOTTI S/A, penG producer, on the research of new and less environmental aggressive ways to obtain this substance. Adsorption is one of the methods of concentration/purification most used by the chemical industry and it is based on the attraction exercised over the product (liquid phase) by a solid phase. The project sponsored by UFSCar/Prodotti/FINEP in progress has as one of its aims the study of the technical availability of substitution of extraction of penG by solvents for extraction by adsorption in hydrophobic resins. The penG, which is a weak acid, has therefore a favorable adsorption in low pH values. Nevertheless, penG can degrade itself under such conditions of pH, being required, in this way, adequate conditions for the operation.

Therefore, the objective of this assignment was evaluate the influence of pH and temperature on the efficiency on adsorption of penG by hydrophobic resins, seeking conditions for maximum efficiency that do not result in degradation. Initially, it was necessary to develop the methodology that could allowed that analysis of a huge amount of penG samples in culture medium, which means that the penG could be analyzed in the presence of other nutrients and also could be distinguished between the intact and the degraded form. Some methods such as CLAE, iodometric and bioassay were analyzed and the conclusion was the CLAE method was necessary and also was able to quantify the penG's degradation rate. This features allowed the studies of penG's stability when exposed to different value pH and temperatures, the maximum half-life that it was stable in each condition and the time of growth, which means that it was possible to determine the time that the variation in the medium's concentration that did not affect the quantification of penG. Nevertheless, the CLAE method is very expensive to be applied to a large number of samples originated from culture medium. With this in mind, a new methodology was developed based on the complete hydrolysis of penG catalyzed by the penicillin G acilase, and this reaction proved to be precise and reproducible, reasons for being chosen in the later steps of this study. The efficiency of adsorption of penG was

evaluated in the resins XAD-4, XAD-7, XAD-761 and activated carbon, and the XAD-4 resin has shown to be the most efficient with little increment of efficiency at pH 4.0 (44%) when compared to pH 6.0 (36%). Therefore, the XAD-4 resin was studied for parameters such as adsorption kinetics and the isotherms of adsorption were determined in different value of pH and temperatures. The Langmuir's isotherm had the best fit into the data collected in all the conditions, with maximum value of $q_{\max} = 595.06 \pm 51.54$ mg penG/g resin, at pH 4 and 4°C.

In order to analyze the adsorptions in value of pH lower than 4.0 without the occurrence of penG's degradation that usually occurs at high concentrations of this molecule and at value of pH lower than 4.0, two strategies referring to the adsorption conditions were studied. For the first one, the fermentative broth's pH is adjusted and right after this same broth is maintained in contact with the adsorbent. For the second method, the adsorbent was add to the fermentative broth at a pH of 7.0 and with the adsorption process the pH was reduced until reach the complete adsorption of the penG. The last process showed a better efficiency of adsorption of 0.77g penG/g resin and productivity of 0.31 g penG/g resin/hour at pH 4.0, meanwhile the direct adsorption at pH 4.0 had an efficiency of 0.548g penG/g resin (0.548 g penG/g resin/hour). The second strategy with the gradient is better since it increases the efficiency and decreases the productivity of the process. The results showed that the ideal situation would be to work with pH values even lower than 4, but elevated concentrations of penG will lead to the degradation of the antibiotic in this pH range.

The desorption of penG was studied using a technique of experimental planning and analysis such as pH, temperature and composition of mixture water/ethanol. The results showed that to obtain a maximum desorption, the process must be effectuated at 8°C and utilizes as eluent a mixture of 82.5% ethanol and 17.5% water on a pH of 6.2.

ÍNDICE

RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	iii
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1 ANTIBIÓTICOS	3
2.2 PENICILINAS	3
2.2.1 ESTRUTURA QUÍMICA DAS PENICILINAS	3
2.2.2 PENICILINAS SEMI – SINTÉTICAS	5
2.3 PENICILINA G	5
2.3.1 ESTABILIDADE.....	6
2.3.2 PROCESSO DE PRODUÇÃO INDUSTRIAL.....	9
2.3.3 MÉTODOS DE SEPARAÇÃO.....	10
2.3.3.1 PURIFICAÇÃO POR EXTRAÇÃO COM SOLVENTE	10
2.3.3.2 OUTROS MÉTODOS DE PURIFICAÇÃO.....	11
2.4 ADSORÇÃO	12
2.4.1 TIPOS DE ADSORÇÃO	13
2.4.2 ADSORVENTES.....	14
2.4.2.1 CARVÃO ATIVADO	16
2.4.2.2 AMBERLITE XAD	17
2.4.2.2.1 AMBERLITE XAD-4	18
2.4.2.2.2 AMBERLITE XAD- 7	19
2.4.2.2.3 AMBERLITE XAD- 761	20
2.4.3 EQUILÍBRIO DE ADSORÇÃO.....	20
2.4.3.1 ISOTERMA LINEAR.....	22
2.4.3.2 ISOTERMA DE LANGMUIR	23
2.4.3.3 ISOTERMA DE FREUNDLICH	24
2.4.4 SISTEMAS TÍPICOS DE ADSORÇÃO.....	25
2.4.5 RECUPERAÇÃO DE PRODUTOS BIOTECNOLÓGICOS POR ADSORÇÃO EM BATELADA	26
2.5 DESSORÇÃO	28
2.6 PLANEJAMENTO ESTATÍSTICO DE EXPERIMENTO	28
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	31
3.1 MATERIAIS	31
3.2 MÉTODOS	31
3.2.1 PROCESSO DE PRODUÇÃO DE PENICILINA G.....	31
3.2.2 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE PENG	32
3.2.2.1 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE).....	32
3.2.2.2 MÉTODO IODOMÉTRICO.....	33
3.2.2.3 BIOENSAIO.....	33
3.2.2.4 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE PENG.....	34
3.2.3 DETERMINAÇÃO DA SOLUBILIDADE DE PENG EM DIFERENTES SOLUÇÕES	34
3.2.4 DETERMINAÇÃO DA ESTABILIDADE DE PENG FRENTE A PH E TEMPERATURA	35
3.2.5 ENSAIOS DE ADSORÇÃO EM BATELADA.....	35
3.2.5.1 TRATAMENTO DOS ADSORVENTES	35
3.2.5.2 EFICIÊNCIA DE ADSORÇÃO DE PENG: SELEÇÃO DE RESINA.....	35
3.2.5.3 DETERMINAÇÃO DO TEMPO DE EQUILÍBRIO - CINÉTICA DE ADSORÇÃO	36
3.2.5.4 ISOTERMAS DE EQUILÍBRIO.....	36
3.2.5.5 ENSAIOS DE ADSORÇÃO DE PENICILINA G.....	37

3.2.6 ENSAIOS DE DESSORÇÃO EM BATELADA	37
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
4.1 ESTUDO DA QUANTIFICAÇÃO DE PENICILINA G EM MEIO DE CULTIVO.....	38
4.1.1 COMPARAÇÃO ENTRE MÉTODOS JÁ UTILIZADOS.....	38
4.1.2 DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO ENZIMÁTICO PARA A QUANTIFICAÇÃO DE PENG.....	40
4.2 INFLUÊNCIA DA COMPOSIÇÃO (TEMPO DE CULTIVO) DO MEIO DE CULTIVO NA ANÁLISE CROMATOGRÁFICA DE PENICILINA G.....	41
4.3 TESTES DE ESTABILIDADE DA PENICILINA G EM MEIO AQUOSO	43
4.4 EFICIÊNCIA DE DIFERENTES ADSORVENTES NA SEPARAÇÃO DE PENICILINA G EM DIFERENTES VALORES DE PH.....	46
4.5 DETERMINAÇÃO DO TEMPO DE EQUILÍBRIO - CINÉTICA DE ADSORÇÃO.....	50
4.6 ISOTERMAS DE ADSORÇÃO	50
4.7 ESTRATÉGIAS DE ADSORÇÃO DE PENICILINA G	55
4.7.1 DESENVOLVIMENTO DO PROCESSO DE ADSORÇÃO DE PENICILINA G COM GRADIENTE DE PH.....	55
4.8 DESSORÇÃO DE PENICILINA G	59
4.9 PUREZA DA PENG AO FINAL DO PROCESSO DE PURIFICAÇÃO.....	68
4.10 SOLUBILIDADE DE PENICILINA G EM DIFERENTES SOLVENTES	70
5 CONCLUSÕES.....	73
6 SUGESTÕES.....	75
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	76

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1.: Estrutura básica da molécula de penicilina.....	4
Figura 2.2.: Estrutura do ácido 6-amino penicilânico (6-APA)	4
Figura 2.3.: Esquema da hidrólise de penicilina G catalisada pela enzima penicilina G acilase	5
Figura 2.4.: Reação do anel β -lactâmico (Arnott <i>et al</i> , 1995).....	8
Figura 2.5.: Esquema da degradação ácida da penicilina. (Arnott <i>et al</i> , 1995).....	8
Figura 2.6.: Esquema da produção industrial de penicilina G (Menezes,1996).....	9
Figura 2.7.: Separação da penicilina com acetato de amila, em três estágios e em contracorrente (Treybal, 1980).....	10
Figura 2.8.: Esquema de um trocador catiônico (A) e aniônico (B) (Collins <i>et al</i> , 1995) .	15
Figura 2.9.: Estrutura química básica do carvão ativado.....	17
Figura 2.10.: Estrutura química da resina Amberlite XAD-4.....	19
Figura 2.11.: Estrutura química da resina Amberlite XAD-7.....	19
Figura 2.12.: Diagrama das isotermas: (a) favorável, (b) linear e (c) desfavorável	21
Figura 2.13.: Isotermas comuns de adsorção (Belter <i>et al</i> , 1988).	22
Figura 2.14.: Etapas de transporte de massa na adsorção utilizando adsorventes porosos (Sleijko, 1985).	25
Figura 3.1.: Curva de calibração de penicilina G em água utilizando o cromatógrafo modelo CLASS - LC10	32
Figura 3.2.: Curva de calibração de penicilina G em caldo de cultivo utilizando o cromatógrafo modelo CLASS VP	33
Figura 4.1.: Curva de calibração de penicilina G utilizando a hidrólise de penG.....	41
Figura 4.2.:Curvas de calibração para quantificar penG presente em caldo de cultivo obtido com diferentes tempos. Análise em HPLC, coluna C-18, μ BondPack, 3,9x 300mm e fase móvel 20% acetoneitrila, 80% tampão fosfato 10mM, pH 6,5, tiosulfato de sódio 10mM em uma vazão de 1 mL.min ⁻¹	42
Figura 4.3.: Gráfico da estabilidade de PenG a 4°C em diferentes valores de pH (a) 2,0 (b) 2,5, (c) 3,0, (d) 4,0, (e) 5,0, (f)7,0.....	44
Figura 4.4.: Gráfico da estabilidade de PenG a 12°C em diferentes valores de pH (a) 2,0 (b) 2,5, (c) 3,0, (d) 4,0, (e) 5,0, (f)7,0.	45
Figura 4.5.: Esquema da Adsorção em Carvão Ativado e gráfico da quantidade de penG adsorvida, em meio aquoso (a) e em caldo (b).....	47
Figura 4.6.: Gráfico da adsorção de penG em XAD-4, XAD-7, XAD-761 e carvão ativado, a 4°C, pH 6,0, 1h, utilizando 0,25g (em base seca) de adsorvente pré-tratado para 5 mL de caldo de cultivo contendo 50 g.L ⁻¹ de penG.....	47
Figura 4.7.: Gráfico da adsorção de penG em XAD-4, XAD-7, XAD-761 e carvão ativado, a 4°C, pH 4,0, 1h, utilizando 0,25g (em base seca) de adsorvente pré-tratado para 5 mL de caldo de cultivo contendo 50 g.L ⁻¹ de penG.....	48
Figura 4.8.: Gráfico da adsorção de penG em XAD-4, XAD-7, XAD-761 e carvão ativado, a 4°C, pH 5,0, 1h, utilizando 0,25g (em base seca) de adsorvente pré-tratado para 5 mL de caldo de cultivo contendo 50 g.L ⁻¹ de penG.....	48
Figura 4.9.: Efeito do pH sobre a eficiência de adsorção	49

Figura 4.10.: Cinética de Adsorção (a) 4°C e (b) 12°C, utilizando-se 0,1 g (em base seca) de XAD-4 pré-tratada para 2 mL de caldo de cultivo de concentração de penG de 50 g.L ⁻¹ em valores de pH 4,0; 5,0 e 7,0.....	50
Figura 4.11.: Isotermas de Adsorção- Modelo de Langmuir, utilizando 0,1 g (em base seca) de XAD-4 pré-tratado para 2mL de caldo de cultivo.....	52
Figura 4.12.: Isotermas de Adsorção- Modelo de Langmuir, utilizando 0,1 g (em base seca) de XAD-4 pré-tratado para 2mL de água deionizada.....	54
Figura 4.13.: Resultados da adsorção de penG a 4°C na faixa de pH de 3,5 a 7,0 utilizando 2 g de XAD-4 adicionados gradativamente em 40mL de caldo com 50g.L ⁻¹ de penG.....	56
Figura 4.14.: Resultados da adsorção de penG a 4°C na faixa de pH de 3,2 a 7,0 utilizando 2 g de XAD-4 adicionado gradativamente em 40 mL de caldo com 50 g.L ⁻¹ de penG.....	57
Figura 4.15.: Resultados da adsorção de penG a 4°C na faixa de pH de 3,5 a 4,0 utilizando 1,5g de XAD-4 adicionado em 18mL de caldo com 50g.L ⁻¹ de penG.....	58
Figura 4.16.: Diagrama de Pareto para o 1º delineamento.....	61
Figura 4.17.: Valores experimentais <i>versus</i> valores previstos pelo modelo para a resposta no 1º delineamento.....	62
Figura 4.18.: Distribuição dos resíduos em torno da reta que indica normalidade para a resposta no 1º delineamento.....	62
Figura 4.19.: Superfícies de resposta e curva de contorno para a dessorção de penG (%) em função da temperatura e pH (a) e (b), da temperatura e [EtOH] (c) e (d) e do pH e [EtOH] (e) e (f) no 1º delineamento.....	63
Figura 4.20.: Diagrama de Pareto para o 2º delineamento.....	65
Figura 4.21.: Valores experimentais <i>versus</i> valores previstos pelo modelo para a resposta no 2º delineamento.....	66
Figura 4.22.: Distribuição dos resíduos em torno da reta que indica normalidade para a resposta no 2º delineamento.....	67
Figura 4.23.: Superfícies de resposta para a dessorção de penG (%) em função da temperatura e [EtOH] no 2º delineamento.....	67
Figura 4.24.: Curva de contorno para a dessorção de penG (%) em função da temperatura e [EtOH] no 2º delineamento.....	68
Figura 4.25.: Cromatogramas referentes ao processo de purificação de penG. Linha verde: caldo fermentativo contendo penG 50 g.L ⁻¹ e Linha vermelha componentes do caldo fermentativo dessorvidos com etanol 82,5%......	69
Figura 4.26.: caldo de cultivo antes da adsorção e depois da dessorção com solução etanólica.....	70
Figura 4.27.: Solubilidade da penG em mistura de etanol-água a pH 6,2 em diferentes temperaturas (0 , 8 e 16°C).....	71

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 2.1.: Base físico-química para o desenvolvimento de processos de separação (Ghosh <i>et al</i> , 1996).....	11
Tabela 2.2.:Características da adsorção física e da adsorção química	13
Tabela 2.3.:Propriedades físicas dos adsorventes Amberlite XAD-4 e XAD-7 e XAD-761.	20
Tabela 4.1.: Teste comparativo entre os métodos para quantificar penicilinaG. Amostras: (1) solução de penG sem a hidrólise por penicilinase , (2) solução de penG na mesma concentração hidrolisada por penicilinase por 30 min e (3) solução de penG na mesma concentração hidrolisada por penicilinase por 60 min. Condições de diluição com tampão fosfato 100mM: 1:500 (bioensaio), 1:4 (iodometria) e 1:1 (CLAE).....	39
Tabela 4.2.: Estudo comparativo CLAE x Hidrólise enzimática	40
Tabela 4.3.: Dados de estabilidade de PenG frente a pH	46
Tabela 4.4.: Resultados experimentais obtidos na determinação da isoterma de equilíbrio para penG utilizando XAD-4, em pH 4 e 7 e temperatura 4°C e 12°C, utilizando 0,1 g (em base seca) de XAD-4 pré-tratado para 2mL de caldo de cultivo.....	51
Tabela 4.5.: Parâmetros Aparentes de Ajuste dos modelos de Langmuir, Freundlich e Linear para a penG e seus coeficientes de correlação.....	52
Tabela 4.6.: Porcentagem de penG na sua forma neutra e iônica em diferentes valores de pH.....	53
Tabela 4.7.: Resultados experimentais obtidos na determinação da isoterma de equilíbrio para penG utilizando XAD-4, em pH 4 e temperatura 4°C, utilizando 0,1 g (em base seca) de XAD-4 pré-tratado para 2mL de água deionizada.....	54
Tabela 4.8.: Parâmetros Aparentes de Ajuste dos modelos de Langmuir para a penG e seus coeficientes de correlação.....	55
Tabela 4.9.: Valores utilizados do 1º DCCR para três fatores	60
Tabela 4.10.: Valores codificados e resposta da porcentagem de penG dessorvida no 1º delineamento	60
Tabela 4.11.: Coeficientes de regressão para a resposta no 1º delineamento.....	61
Tabela 4.12.: ANOVA para a resposta no 1º delineamento	62
Tabela 4.13.: Valores utilizados do 2º DCCR para dois fatores.....	64
Tabela 4.14.: Valores codificados e resposta da porcentagem de penG dessorvida no 2º delineamento	64
Tabela 4.15.: Coeficientes de regressão para a resposta no 2º delineamento.....	65
Tabela 4.16.: ANOVA para a resposta no 2º delineamento	66
Tabela 4.17.: Relação dos picos dos cromatogramas referentes ao processo de purificação e os respectivos valores de suas áreas	69
Tabela 4.18.: Solubilidade da penG em diferente solventes a 8°C e pH 6,2.....	71
Tabela 5.1.: Resumo das condições definidas para o processo de purificação de penG por adsorção em resina Amberlite XAD-4 em batelada.....	74

NOMENCLATURA

%EA	Porcentagem de eficiência de adsorção	%
6-APA	Ácido 6-amino penicilânico	
7-ACA	Ácido 7-amino cefalosporânico	
a	Área do pico na análise por CLAE	
A	Forma iônica	
ABS	Absorbância	
AFA	Ácido fenil acético	
AFNA	Ácido fenoxi acético	
AMM	Água de maceração de milho	
AMPI	Ampicilina	
C*	Concentração de soluto em solução no equilíbrio	mg/ mL
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência	
C _o	Concentração inicial de soluto	mg/mL
CPC	Cefalosporina C	
D _{HALO}	Diâmetro do halo no bioensaio	cm
DCCR	Delineamento composto central rotacional	
EMPG	Éster metílico de fenilglicina	
EtOH	Etanol	
FG	D-fenilglicina	
HA	Forma neutra	
K _F	Constante de equilíbrio de Freundlich	mL/ mg resina
K _H	Constante de equilíbrio de Henry	mL/ mg resina
K _L	Constante de equilíbrio de Langmuir	mg / mL
L	Efeito principal linear da regressão	
n	Índice da isoterma de Freundlich	
OD	Densidade óptica	
PDAB	p-dimetilaminobenzaldeído	
penG	Penicilina G	
PGA	Penicilina G acilase	
pI	Ponto isoelétrico	
pKa	Constante de equilíbrio de ionização	
Q	Efeito principal quadrático da regressão	
q*	Quantidade de soluto adsorvida pela resina no equilíbrio	mg/ g resina
qm	Capacidade máxima de adsorção da resina	mg / g resina
V _L	Volume de solução	mL
w	Massa de resina	mg

1 INTRODUÇÃO

O processamento final de produtos biotecnológicos, que envolve as etapas de separação, concentração e purificação, é usualmente responsável por grande parte do custo de produção desses compostos.

A enorme competição existente em nível mundial no setor da indústria de processos biotecnológicos em geral, e particularmente da indústria farmacêutica, vem colocando dois tipos de desafios. O primeiro tipo é análogo àquele enfrentado pela indústria química convencional a partir da década de 70: aumentar a eficiência dos processos. O segundo desafio diz respeito às crescentes exigências de agências governamentais, no sentido da redução de impactos ambientais. Em outras palavras, a busca por processos “limpos” ou de “química verde”, ecologicamente sustentáveis, é uma das forças-motrices do desenvolvimento de novos processos bioquímicos e farmacêuticos industriais.

A produção de penicilina G se constitui em um clássico processo industrial, onde o processo de recuperação do produto por extração com solvente orgânico já está bem estabelecido. No Brasil, a única empresa que ainda detém tecnologia para produção de penG (microrganismo de alta produtividade, tecnologia, equipamentos) é a Prodotti S/A. Essa empresa, localizada na Av. João Dias, São Paulo-SP, nas instalações que eram ocupadas pela SQUIBB, está hoje rodeada pela cidade e tem por isso sérios problemas ambientais pela incompatibilidade de operação industrial numa agora região urbana. Esses problemas vêm motivando a Prodotti a trabalhar com processos mais limpos, tais como a síntese enzimática de ampicilina, na qual já vem trabalhando com o grupo da UFSCar através de Projeto PIPE-FAPESP (proc.03/13177-4) e projeto FINEP - Ação Transversal (Inovações da Produção de Antibióticos β -Lactâmicos com Redução de Impactos Ambientais), ambos em andamento. O processo clássico utilizado na indústria para produção de penicilina G utiliza a extração com um solvente altamente hidrofóbico (acetato de amila, por exemplo) para separação do antibiótico do meio de cultivo. O escape desse solvente para o ambiente, bem como presença dele nos efluentes líquidos da indústria, mesmo que em baixas concentrações aumenta o impacto ambiental do processo. Por essa razão, foi proposto, também, como objetivo do projeto FINEP o estudo da viabilidade técnica da substituição do processo de extração de penicilina G por solvente por outro menos agressivo ao ambiente.

A utilização de adsorventes poliméricos para processos de purificação e para recuperação de compostos a partir de soluções diluídas tem sido estudada com muito interesse nos últimos anos. As principais vantagens da utilização destes adsorventes são sua seletividade e facilidade de regeneração. Os adsorventes poliméricos neutros mais comuns são os constituídos por co-polímeros de estireno (ou etilvinilbenzeno) e divinilbenzeno. Durante anos, esses adsorventes têm sido desenvolvidos para oferecer a resistência mecânica necessária, apresentarem grandes áreas superficiais para adsorção e possuírem tamanhos de poros apropriados (Grzegorzczk *et al*, 1996).

O desenvolvimento de um processo de separação eficiente e seletivo que utilize adsorventes poliméricos requer conhecimento da influência das condições de operação (pH, força iônica, temperatura, concentração de composto na corrente de entrada) sobre o fenômeno de adsorção (Vieira *et al*, 2003). Foi, assim, objetivo deste trabalho, determinar inicialmente os limites operacionais do estudo em termos de estabilidade da penG e a seguir se avaliar a influência do tipo de resina, do pH e da temperatura na eficiência de adsorção desse antibiótico em resinas hidrofóbicas. Para a(s) resina(s) e condições selecionadas, foram determinadas as isotermas de adsorção e estudadas as condições de dessorção utilizando-se água e/ou etanol. O estudo foi realizado em água e em caldo de cultivo para se avaliar a influência da presença de outros componentes na adsorção de penG.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 ANTIBIÓTICOS

Os antibióticos são produtos do metabolismo secundário de alguns microrganismos que inibem o processo de crescimento de outros organismos. Eles formam um tipo especial de agentes quimioterápicos pelo fato de serem produtos metabólicos fortemente ativos, mesmo em concentrações muito pequenas.

A inibição do processo de crescimento de um microrganismo por outro já era conhecida há muito tempo. Em 1881, Tyndall verificou que meios de cultura turvos pelo crescimento bacteriano se tornavam límpidos quando cresciam fungos em sua superfície. O exemplo de maior destaque data de 1929 quando Alexander Fleming notou a inibição do crescimento bacteriano em uma placa de Petri com ágar contaminada com o fungo *Penicillium notatum*. A substância produzida pelo fungo recebeu o nome de “penicilina”. (Crueger, 1984)

Durante a Segunda Guerra Mundial, a forte demanda de agentes quimioterápicos para o tratamento de infecções causadas pelos ferimentos deu origem ao desenvolvimento de um processo de produção para a penicilina, iniciando-se assim, a era dos antibióticos.

2.2 PENICILINAS

A descoberta da penicilina, o primeiro antibiótico que encontrou uso prático no homem, marcou o início de uma era que produziu grande número de tais substâncias. As primeiras penicilinas, biossintéticas ou naturais, ainda hoje estão em uso clínico. Outras, semi-sintéticas, com amplo espectro e melhores propriedades farmacocinéticas, foram sendo utilizadas no decorrer dos anos (Ligon, 2004)

2.2.1 ESTRUTURA QUÍMICA DAS PENICILINAS

As penicilinas compõem uma classe terapêutica de antibióticos com estruturas relacionadas e com propriedades e atividades ligeiramente diferenciadas. A estrutura de todas as penicilinas, mostrada na Figura 2.1, apresenta um núcleo comum, o ácido 6-amino penicilâmico (6-APA), mostrado na Figura 2.2.

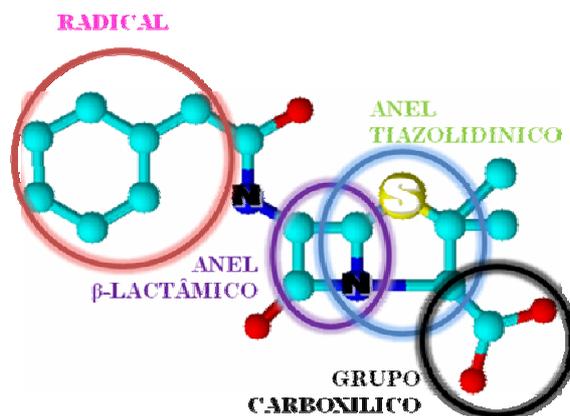


Figura 2.1.: Estrutura básica da molécula de penicilina.

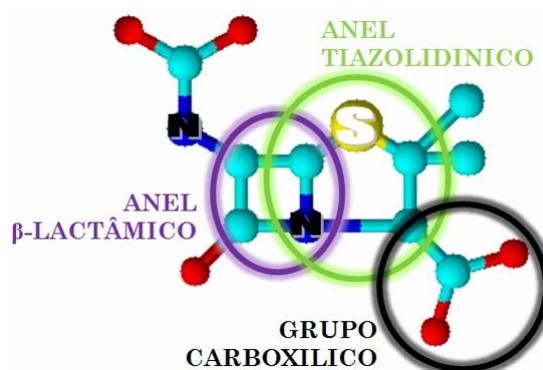


Figura 2.2.: Estrutura do ácido 6-amino penicilânico (6-APA)

O anel β -lactâmico, presente no 6-APA, é responsável pela atividade de todas as penicilinas. Além desse anel, o 6-APA sua estrutura contém um anel de quatro membros chamado β -lactâmico e um anel de cinco membros denominado anel tiazolidínico. A existência do anel β -lactâmico em todas as penicilinas é responsável pela designação geral destes antibióticos de antibióticos β -lactâmicos.

Na ausência de precursor (ácido da cadeia lateral) o *Penicillium chrysogenum* produz baixa concentração de 6-APA, além de misturas de penicilinas. As penicilinas naturais com interesse industrial e econômico, atualmente, são a penicilina G (benzilpenicilina) e a penicilina V (fenoximetilpenicilina) (Hillenga, 1995).

A obtenção de uma dada penicilina está, conforme já comentado, relacionada com o tipo de precursor utilizado. Assim, o fornecimento de sais de ácido fenil acético (AFA) leva à formação exclusiva de penG, enquanto que o fornecimento de sais de ácido fenoxi acético (AFNA) leva à formação exclusiva de penicilina V.

As penicilinas naturais podem ser destruídas por enzimas denominadas penicilinasas. Essas enzimas rompem o anel β -lactâmico do núcleo básico da molécula, através da

A penicilina G possui um pKa de 2,74. Sua forma neutra é pouco solúvel em água. É um ácido orgânico fraco. A concentração da sua forma ionizada (polar) varia com o pH e, conseqüentemente, varia sua solubilidade em água.

A variação da concentração da forma iônica da penG com o pH determina também sua absorção pelo organismo. No estômago, onde o pH é 2,0 tem-se 15,4% das moléculas de penG na forma iônica e 84,60% na forma neutra. No duodeno, onde o pH é 6,0 tem-se 99,95% das moléculas ionizadas. Somente a forma neutra, apolar, consegue atravessar a barreira lipídica da membrana celular. O mesmo fenômeno explica a eficiência da extração de pen G em solvente apolar nos baixos valores de pH utilizados na indústria e faz prever a viabilidade de sua adsorção eficiente em resinas hidrofóbicas.

2.3.1 ESTABILIDADE

Uma característica importante de penicilinas para seu processamento industrial é sua estabilidade.

A integridade estrutural do anel β -lactâmico do ácido 6-aminopenicilânico é primordial para a atividade das penicilinas e cefalosporinas, com a ruptura da ligação amida desse anel resultando num produto biologicamente inativo. Esse anel é a parte da molécula dos antibióticos β -lactâmicos que se encaixa no sítio ativo da enzima responsável pela síntese das peptoglicanas, que formam a parede celular das bactérias. A ação antibacteriana da penicilina se deve ao fato de que sua presença impede a formação de uma parede correta, a qual fica, portanto, facilmente sujeita a lise celular. A reação de abertura do anel pode ser catalisada por ácido, base ou pela enzima β -lactamase, que é produzida por bactérias resistentes a antibióticos β -lactâmicos. A degradação de penG é influenciada pelo pH, grau de cristalinidade, força iônica, íons metálicos e composição do solvente (Arnott *et al*, 1995).

Navarro et al, 2003, apud Strominger, 1967, relatam que a atividade biológica dos antibióticos β -lactâmicos é atribuída à grande reatividade do anel. Essa reatividade é devida à tensão estrutural do anel β -lactâmico, que ocorre devido ao fato do ângulo de ligação entre os átomos (90°) ser inferior ao correspondente ângulo de sp^3 híbrido ($109,47^\circ$) ou sp^2 (120°). Dessa forma, a característica de ressonância da ligação amida, responsável por sua grande estabilidade, é inibida, resultando na conhecida instabilidade da estrutura do anel β -lactâmico.

É relatado que a ruptura do anel β -lactâmico é exotérmica, por causa da grande quantidade de energia liberada na fissão da ligação carbono-nitrogênio. (Michinik, 2004, apud Pikal *et al*, 1978)

Navarro *et al* (2003) acompanharam a metanólise de quatro antibióticos β -lactâmicos (PenG, Penicilina V, Ampicilina e Amoxicilina) em reação catalisada por Zn^{2+} , para estudarem a estabilidade dessas moléculas. Verificaram que a reação de degradação ocorre através da formação de dois complexos metálicos com a penicilina intacta, que se decompõem a diferentes velocidades para gerarem produtos idênticos. Compararam os resultados entre si e entre os obtidos na presença de Cd^{2+} (Navarro *et al*, 1999) e verificaram que a velocidade de degradação de penicilinas em metanol catalisada por íon cádmio é muito maior que a catalisada por íon zinco.

A absorção de penicilina, que requer a sua passagem pela barreira lipídica da membrana celular, é um fenômeno semelhante ao da sua extração e da sua adsorção em um meio hidrofóbico. Quanto menor o pH, mais moléculas de penG estarão na forma eletricamente neutra e, portanto, terão mais facilidade em se transferir para o meio hidrofóbico (lipídeos da membrana ou solvente orgânico ou resina hidrofóbica). Contudo, a molécula é instável a pH ácido. O pH ótimo de adsorção/extração deverá ser assim uma solução de compromisso entre coeficiente de partição e estabilidade da molécula no tempo necessário de contacto.

A temperatura de operação é outra variável importante. A adsorção é exotérmica e o equilíbrio assim deverá ser favorecido a baixas temperaturas. A menor temperatura deverá também favorecer a estabilidade da molécula no baixo pH, uma vez que diminui a velocidade da reação de abertura do anel β -lactâmico catalisada pelos íons H^+ . Contudo, na menor temperatura, o tempo necessário para ocorrer a adsorção irá aumentar, havendo, pois uma solução de compromisso entre quantidade adsorvida e tempo necessário para que ocorra essa adsorção.

Estudos foram realizados para minimizar perdas por degradação. Arnott *et al* (1995) estudaram o efeito do campo elétrico de alta voltagem na degradação de penG. Segundo Arnott *et al* (1995), a aplicação do campo elétrico durante a extração por solvente oferece significativas vantagens sobre outras técnicas de intensificação.

Benedict *et al* (1945) estudando a estabilidade de penG a diferentes valores de pH, identificaram a estabilidade ótima desta a pH 6,0, com meia vida de 396h em 24°C, que foi

2.3.2 PROCESSO DE PRODUÇÃO INDUSTRIAL

A penicilina é produzida industrialmente pelo cultivo aeróbico do fungo *Penicillium chrysogenum* ou outro, em reatores agitados, com aeração, operados de forma semi-descontínua (isto é, alimentação contínua de várias substâncias em um cultivo descontínuo) (Menezes, 1996).

A Figura 2.6 mostra um esquema da produção industrial de penG.

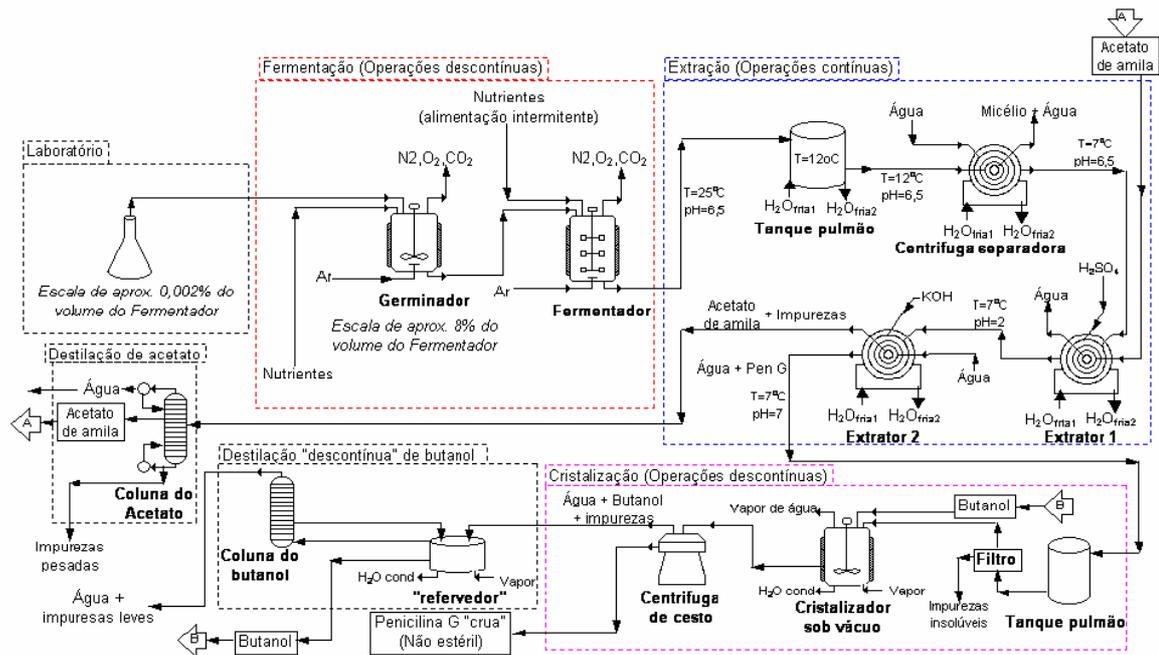


Figura 2.6.: Esquema da produção industrial de penicilina G (Menezes,1996).

O tanque de cultivo é carregado com um substrato, que pode ser composto de açúcar (exemplos: glicose ou sacarose), água de maceração de milho (AMM) e outras substâncias (exemplo: sais), que são fonte de carboidratos, nitrogênio e nutrientes (Menezes, 1996).

Um exemplo de produção industrial de penG se inicia com a preparação do inóculo para a fermentação, com a inoculação de balões de 500 mL, contendo 100 mL de meio de cultura, com esporos de *Penicillium chrysogenum*. Os balões são em seguida colocados num agitador orbital, numa câmara a 25°C e após 4 dias o caldo de cultura resultante é utilizado para inocular balões contendo 2 L de meio. O caldo dessa segunda etapa em balões é utilizado como inóculo para nova propagação, com a duração de apenas 2 dias, num tanque de 100 L com agitação, aeração, arrefecimento e controle de pH e temperatura. Por fim, num tanque com 500 L de meio, produz-se, após 3 dias, um volume de cultura suficiente para inocular até 120 m³ de meio em tanques com 200 m³ de capacidade (Menezes, 1996).

Após a inoculação do meio segue-se uma fase breve de operação descontínua (cerca de 12 h). A partir daí se iniciam adições controladas de açúcar e outras substâncias (ácido fenilacético, sais, óleos vegetais, gorduras animais, amônia e ácido para correção do pH) em quantidades suficientes para manter constante o teor de biomassa na fase de produção da penicilina. A regulação das adições é estabelecida empiricamente para cada estirpe de fungo (Menezes, 1996).

A condução desse processo é quase exclusivamente manual, sendo apenas controlados automaticamente a concentração de O_2 dissolvido, o pH e a temperatura. O pH e a temperatura são mantidos constantes (6,5 e 25-27°C) e a velocidade de aeração está geralmente entre 0,5 e 1,0 m^3 de ar/ m^3 de meio/min (Menezes, 1996).

A purificação da penicilina, após a fase de fermentação, é feita através de várias etapas rápidas de extração líquido-líquido do caldo fermentado, ora com um solvente orgânico (por exemplo, acetato de amila ou butila, ou metil isobutil cetona), ora com uma solução aquosa, sob baixa temperatura (de 0 a 3°C) e com controle rígido de pH. O resultado final é um sal de penicilina (sal de potássio, sódio ou de procaína, dentre outros) (Menezes, 1996).

2.3.3 MÉTODOS DE SEPARAÇÃO

2.3.3.1 PURIFICAÇÃO POR EXTRAÇÃO COM SOLVENTE

A extração líquido-líquido por meio de solventes orgânicos é o processo que vem sendo utilizado na indústria para separação de penG do caldo de cultivo. Os principais solventes utilizados na extração são a acetona, o acetato de amila, o acetato de butila, o hexano, entre outros (Treybal, 1980).

Na extração da penicilina, utilizam-se extratores com três estágios operando em contracorrente, como representado na Figura 2.7.

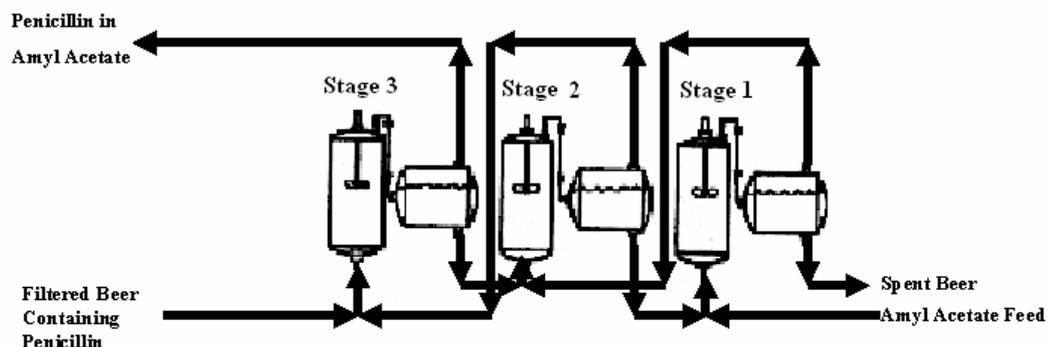


Figura 2.7.: Separação da penicilina com acetato de amila, em três estágios e em contracorrente (Treybal, 1980)

A corrente que contém a maior concentração de penicilina é a que está saindo no terceiro estágio, ou seja, corrente de solventes com penicilina, enquanto nos dois estágios anteriores a corrente de solvente contém pouca penicilina.

Como penG é um ácido fraco, sua forma neutra é extraída na fase orgânica (apolar).



Assim, o primeiro passo na extração é ajustar o pH da fase aquosa entre 2 - 2,5 e extrair a penicilina para a fase orgânica (solvente). O extrato é então tratado com uma solução de pH aproximadamente 6,0 para obter uma solução aquosa rica em penicilina. Para o próximo passo, o pH é novamente ajustado com ácido para um valor baixo e a penicilina é novamente extraída pelo solvente obtendo uma solução concentrada pura.

A operação de extração é realizada com dificuldade, pois a penicilina degrada rapidamente com a redução do pH. Assim para a extração em temperatura ambiente, é necessário realizar a transferência da penicilina em pH baixo de maneira rápida.

2.3.3.2 OUTROS MÉTODOS DE PURIFICAÇÃO

O desenvolvimento de novos e eficientes métodos de separação se baseia na exploração de características físico-químicas do produto, tais como: carga superficial, hidrofobicidade, peso molecular e bioespecificidade frente a ligantes (íons metálicos), ponto isoelétrico (pI) e estabilidade (Ghosh *et al*, 1996). A Tabela 2.1 mostra alguns processos de separação.

Tabela 2.1.: Base físico-química para o desenvolvimento de processos de separação (Ghosh *et al*, 1996).

Base Físico-Química	Processo de separação
Carga	Cromatografia de troca iônica Eletrodialise Partição em sistema aquoso bifásico Extração por micela reversa
Hidrofobicidade	Cromatografia por interação hidrofóbica Cromatografia de fase reversa Precipitação Partição em sistema aquoso bifásico
Ligação específica	Cromatografia de afinidade
Tamanho	Filtração em gel Ultrafiltração Diálise
Mobilidade elétrica	Eletroforese
Ponto isoelétrico	Cromatografia Cristalização seletiva
Velocidade de sedimentação	Centrifugação
Atividade da superfície	Adsorção Fracionamento
Solubilidade	Extração sólido-líquido Extração supercrítica

A cristalização vem sendo muito utilizada na indústria química como uma maneira de isolar e purificar produtos. Além disso, também é uma ferramenta que permite controlar a forma física de materiais sólidos. A extração líquido-líquido vem sendo utilizada há décadas na indústria de antibióticos (recuperação de penicilina G e penicilina V), sendo que essa técnica pode ser operada continuamente.

2.4 ADSORÇÃO

Nas últimas décadas, com o avanço das pesquisas, bem como com o acentuado desenvolvimento registrado na petroquímica, a adsorção passou a ser utilizada como uma operação unitária importante dentro da Engenharia Química. Atualmente, a adsorção é aplicada em processos de purificação e separação, apresentando-se como uma alternativa importante e economicamente viável em muitos casos.

Segundo Belter (1988), as duas operações unitárias mais comumente usadas para isolar (concentrar) produtos de soluções diluídas são adsorção e extração. A adsorção tende a ter uma menor capacidade, mas uma maior seletividade que a extração.

O processo de adsorção envolve a separação de uma substância de uma fase acompanhada por seu acúmulo ou concentração na superfície de outra. A fase que está adsorvendo é o adsorvente, e o material concentrado ou adsorvido na superfície desta fase é o adsorbato. A adsorção é, então, diferente de absorção, processo no qual o material transferido de uma fase para outra interpenetra a segunda fase para formar uma “solução” (Slejko, 1985).

Usualmente o adsorvente é composto de micropartículas que são empacotadas em um leito fixo por onde passa a fase fluida continuamente até que não haja mais transferência de massa. Uma vez que o adsorbato concentra-se na superfície do adsorvente, quanto maior for esta superfície, maior será a eficiência da adsorção. Por isso, geralmente os adsorventes são sólidos com partículas porosas. (Borba, 2006)

Vários mecanismos podem estar envolvidos na adsorção. Na adsorção física, forças fracas tais como forças de Van der Waals são dominantes; já na adsorção por troca-iônica, ligações iônicas fortes são utilizadas (Shulen *et al*, 1992).

As discussões apresentadas para os processos de adsorção normalmente se referem a adsorção de gases em superfície de sólidos. Contudo, essas interpretações podem ser aplicadas analogamente para compostos dissolvidos em líquidos, o que nos ajuda a visualizar que tipo de fenômeno de adsorção pode ocorrer num determinado processo de adsorção utilizado em separação de produtos biotecnológicos (Barboza, 1998).

Biomoléculas adsorvem seletivamente em uma variedade de fases e, conseqüentemente, técnicas de adsorção vêm se tornando bastantes comuns nas separações de bioprodutos, principalmente por apresentarem ótima resolução (Kennedy *et al*, 1995).

2.4.1 TIPOS DE ADSORÇÃO

O processo de adsorção pode ser subdividido em quatro tipos: adsorção química ou quimissorção, adsorção física ou fisissorção, adsorção de troca iônica e adsorção específica que pode ser por bioafinidade ou por exclusão de tamanho.

A adsorção física é não específica e às vezes é similar aos processos de condensação. As forças de atração das moléculas do fluido no sólido são relativamente fracas e o processo de adsorção ocorre exotermicamente onde o calor envolvido tem a mesma ordem de magnitude do calor de condensação, 0,5 a 5 kcal/gmol. O equilíbrio é geralmente rápido e facilmente reversível, uma vez que a energia requerida à dessorção é pequena. A energia de ativação para adsorção física normalmente não é maior que 1 kcal/gmol, já que as forças envolvidas neste tipo de adsorção são fracas (Smith, 1985).

Uma característica importante da adsorção química é que sua magnitude não excede a camada monomolecular. Esta limitação deve-se ao fato de que as forças de valência que ligam as moléculas na superfície diminuem rapidamente com a distância (Smith, 1985).

Drouguett (1983) comenta que a adsorção física por não ser ativada é muito rápida, instantânea, enquanto que a química por ser ativada pode demorar dias ou semanas para atingir o equilíbrio.

A adsorção pode ser resultante da ligação química entre o sólido adsorvente e o adsorbato presente na fase fluida. Essa ligação ocorre pela troca ou compartilhamento de elétrons com elementos químicos como complexos ou íons metálicos, ligados à superfície do material sólido. Este processo denominado quimissorção é exotérmico, ocorre somente como uma monocamada e é irreversível.

As principais diferenças entrem a adsorção física e química são mostradas na Tabela 2.2.

Tabela 2.2.:Características da adsorção física e da adsorção química

Adsorção Física	Adsorção Química
<ul style="list-style-type: none"> Baixo calor de adsorção (< 2 ou 3 vezes que o calor latente de vaporização). Formação de monocamada ou multicamadas. Não há dissociação das espécies adsorvidas. Somente significativa a baixas temperaturas. Rápida, não ativada, reversível. Não há transferência de elétron embora, possa haver polarização do adsorbato. 	<ul style="list-style-type: none"> Alto calor de adsorção (> 2 ou 3 vezes que o calor latente de vaporização). Somente formação de monocamada. Pode envolver dissociação das espécies adsorvidas. Possível em uma larga escala de temperatura. Ativada, pode ser lenta e irreversível. Ocorre a transferência de elétrons, formando uma ligação entre o adsorbato e o adsorvente.

Fonte: Ruthven, 1984

O termo adsorção se relaciona com processos nos quais moléculas se acumulam na camada interfacial e dessorção denota o processo contrário. Quando o processo de dessorção de uma ou várias espécies iônicas é acompanhado por simultânea dessorção de uma quantidade equivalente de espécies iônicas, este processo é considerado como uma troca iônica (Zambon, 2003).

Na adsorção de 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 deslocamentos por outros íons, com o mesmo tipo de carga, porém com maior força de interação com a fase estacionária (Collins *et al*, 1995).

A adsorção específica pode ser por bioafinidade ou por exclusão. A adsorção por bioafinidade baseia-se principalmente nas propriedades biológicas ou funcionais das espécies que interagem: a substância a ser separada e o adsorvente. O princípio deste processo é o isolamento seletivo de macromoléculas biológicas, através das propriedades dessas substâncias de se unirem reversivelmente a ligantes específicos (Collins *et al*, 1995).

A separação por adsorção é baseada em três distintos mecanismos: mecanismo estérico, de equilíbrio e cinético. No mecanismo de separação estérico, o sólido poroso tem poros com dimensões que permitem a entrada de pequenas moléculas enquanto excluem moléculas grandes. O mecanismo de equilíbrio é baseado nas diferentes capacidades do sólido de acomodar diferentes espécies, isto é, espécies mais fortemente adsorvidas são preferencialmente removidas pelo sólido. O mecanismo cinético é baseado nas diferentes taxas de difusão de diferentes espécies dentro do poro, então, pelo controle do tempo de exposição, a espécie que difunde mais rapidamente é preferencialmente removida pelo sólido (Do, 1998).

2.4.2 ADSORVENTES

Geralmente, o primeiro passo para o desenvolvimento de um processo de adsorção é a procura de um adsorvente adequado à separação desejada, o que inclui estudos de capacidade de adsorção, seletividade, reutilização e estabilidade química e mecânica do material que se pretende utilizar. As matrizes poliméricas mais usadas no processamento de antibióticos são compostas de poliestireno e divinilbenzeno (Belter, 1985). A seleção de um adsorvente inclui também considerações da área superficial bem como o tipo de soluto

e solvente envolvido no processo de adsorção, desde relatos dos tipos de ligações que são formados entre o sólido e o fluido (Hines *et al*, 1985).

Os carvões usados são produtos comerciais e não são manufaturados especificamente para biosseparações. Resinas de troca iônica são baseadas em polímeros sintéticos. Os polímeros normalmente usados contêm cargas fixas como $-\text{SO}_3^-$, $-\text{COO}^-$ ou $-\text{NR}_3^+$, porém eles podem adsorver efetivamente solutos iônicos e não iônico (Figura 2.8). Resinas feitas de estireno e divinilbenzeno muitas vezes adsorvem solutos não polares mais fortemente; resinas baseadas em éster acrílico tendem a ser mais efetiva para solutos hidrofílicos. Adsorventes baseados em hidrogéis são muitas vezes feitos de poliacrilamida, os conhecidos suportes dos géis de eletroforese (Belter *et al*, 1988).

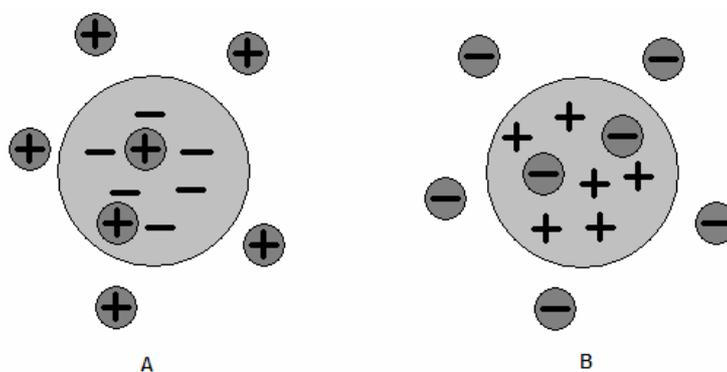


Figura 2.8.: Esquema de um trocador catiônico (A) e aniônico (B) (Collins *et al*, 1995)

Os adsorventes sintéticos são materiais esféricos com alta área superficial e uma superfície hidrofóbica, o que permite a adsorção de compostos orgânicos hidrofóbicos sobre sua superfície. Por esta função seletiva, eles podem ser usados para extração de compostos orgânicos de soluções aquosas tais como caldos de cultivo. Considerando a transferência de massa dos compostos desejados, a função dos adsorventes sintéticos é similar àquela da extração com solventes. Porém, o uso dos adsorventes sintéticos tem muitas vantagens sobre os processos convencionais de extração com solventes (Verral, 1996).

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

do composto desejado é muito baixa, o processo em coluna, com adsorvente empacotado, pode ser muito eficaz (Verral, 1996).

2.4.2.1 CARVÃO ATIVADO

O carvão ativado é o carbono amorfo, que não tem forma determinada nem regular, que foi tratado com vapor d'água e calor até adquirir grande afinidade para adsorver diversas substâncias. São caracterizados por ter uma grande área superficial coberta com uma combinação de oxigênio e hidrogênio. Essa superfície provavelmente consiste de grupos polares reativos. Em 1959, sugeriu-se que a superfície destes carvões teria grupos carbonil, hidroxil, carboxil e lactona. O carvão ativado tem um grande volume de poros pequenos, o que gera uma grande área superficial. Valores típicos de área superficial para estes adsorventes estão entre 600 a 1200 m²/g, sendo que é possível encontrar relatos como 3000 m²/g. Esses poros internos são classificados com base no tamanho dos microporos (10 a 1000Å) ou macroporos (acima de 1000 Å). A adsorção ocorre primeiramente nos microporos com os macroporos atuando como canais condutores (ORNELAS, 2003).

A matéria prima escolhida para a preparação do carvão ativado tem um efeito determinante nas suas propriedades de adsorção. Madeira, côco, lignina, carvão betuminoso, petróleo e lodo de carvão ativado têm sido utilizados como matérias primas.

Não existe um tipo de carvão ativado que seja eficiente para todos os fins. Como descorante, o carvão ativado, com área superficial muito grande e elevado volume de poros, é mais eficiente que o carvão vegetal e o carvão animal (ORNELAS, 2003).

O principal uso do carvão ativado é na purificação de soluções, como nas soluções açucaradas de xarope de cana, de açúcar de beterraba ou de milho e na remoção de gostos e cheiros da água para abastecimento público, de gorduras e de óleos vegetais e animais, de bebidas alcoólicas, de substâncias químicas e de produtos farmacêuticos. A recuperação da estreptomicina (antibiótico produzido por fermentação) constitui uma aplicação típica no tratamento contínuo de efluentes líquidos (ORNELAS, 2003).

O carvão ativado é capaz de adsorver praticamente qualquer solvente orgânico acerca de 40°C e dessorvê-lo quando aquecido a 121,1°C, ou mais para certos compostos. O carvão ativado pode ser obtido, na atualidade, em forma extrudada (ORNELAS, 2003).

Moléculas de alta massa molecular adsorvem preferencialmente em carvão ativado, quando comparadas a moléculas de baixa massa molecular. A adsorção é favorecida para moléculas não polares. Ressalta-se também que o pH da água e a solubilidade do soluto no

solvente são importantes na sua adsorção pelo carvão ativado, devido ao caráter hidrofóbico do carvão. A presença de solutos adicionais afetará as características de adsorção para a remoção de um contaminante específico. Em geral, no entanto, a alta massa molecular do soluto é o principal fator que controla a possibilidade de sua adsorção. Moléculas com três ou mais átomos de carbono usualmente são removidas por adsorção em carvão ativado. Na purificação de produtos biotecnológicos, carvão ativado é utilizado quase que exclusivamente em meio líquido (ORNELAS, 2003). A Figura 2.9 mostra a estrutura química do carvão ativado.

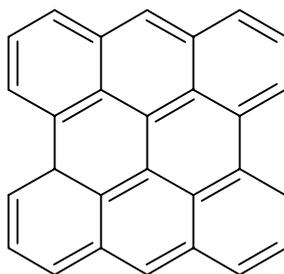


Figura 2.9.: Estrutura química básica do carvão ativado

2.4.2.2 AMBERLITE XAD

Em 1965, Rohm & Haas comercializaram o primeiro adsorvente orgânico sintético macroporoso, também chamado de resina Amberlite XAD. Esses adsorventes foram descritos como pérolas rígidas insolúveis. Possuem alta variedade de área superficial, porosidade e distribuição de tamanho de poros. Devido a estas diferenças nas propriedades de superfície, os adsorventes Amberlite XAD exibem uma ampla faixa de espectros de polaridade de superfície que vai de um extremo não polar até o outro altamente polar. A quantidade relativamente grande de dados de adsorção disponíveis tem demonstrado que os adsorventes Amberlite XAD são altamente versáteis e efetivos como meios de adsorção (Voser, 1982).

Segundo Voser (1982) não é possível prever exatamente quais materiais serão adsorvidos por um dado adsorvente; porém, sob um ponto de vista prático, o conceito geral de que moléculas hidrofóbicas ou não polares ou porções de moléculas são atraídas por superfícies hidrofóbicas e hidrofílicas ou materiais polares a superfícies polares ou hidrofílicas é um conceito proveitoso. Se cada molécula é pensada como tendo ambos os terminais hidrofóbico e hidrofílico, então o terminal hidrofóbico será atraído pelo adsorvente hidrofóbico como Amberlite XAD-4. Isto é particularmente verdade quando a adsorção ocorre a partir de soluções aquosas. Adsorventes de polaridade intermediária ou

hidrofílica como Amberlite XAD-7 terão uma atração por ambos os terminais da molécula, o hidrofóbico e o hidrofílico.

Adsorção sobre resinas poliméricas é um método usado para a remoção de compostos químicos e farmacêuticos a partir de soluções diluídas. O uso destes adsorventes para separação de aminoácidos, a partir de soluções aquosas diluídas, está começando a ser estudada como técnica promissora na separação destes compostos (Doulia *et al*, 2001; Grzegorzczuk *et al*, 1996).

Vieira *et al* (2003), estudaram a adsorção em resinas hidrofóbicas de ampicilina (AMPI), D-fenilglicina (FG), éster metílico de fenilglicina (EMPG) e 6-APA, sendo os dois primeiros produtos e os dois últimos reagentes na síntese de ampicilina, catalisada por penG acilase (PGA). A influência do pH, nas eficiências de adsorção desses compostos, nas resinas XAD-4, XAD-7 e XAD-761, foi avaliada na faixa de pH entre 4,5-8,5. Os valores obtidos a 4°C foram pouco superiores aos obtidos a 25°C. A eficiência de adsorção de AMPI e 6-APA diminuíram com o aumento do pH, para as três resinas. Comportamento oposto foi observado para EMPG, e o pH não afetou a eficiência de adsorção de FG. Os resultados obtidos através de ensaios em batelada mostraram que a resina XAD-4 apresentou os melhores valores de seletividade e capacidade de adsorção. Essa resina atingiu uma razão de ampi/FG= 7,0, ou seja, a resina adsorve 7 vezes mais ampicilina do que fenilglicina a pH 8,5 e apresentou capacidade de adsorção máxima de, aproximadamente, 455 mg de ampicilina/ g de resina, a pH 6,5. Diferentes modelos de equilíbrio de adsorção foram ajustados aos dados experimentais: os modelos Linear e de Langmuir representaram a adsorção de FG e ampicilina sobre a resina XAD-4 a pH 6,5, respectivamente.

2.4.2.2.1 AMBERLITE XAD-4

Amberlite XAD-4 é um adsorvente polimérico (copolímero de estireno-divinilbenzeno) na forma de grânulos brancos. É um polímero não iônico, cujas propriedades de adsorção derivam da sua estrutura devido à natureza aromática na sua superfície e apresenta elevada área superficial. A estrutura permite excelente estabilidade física, química e térmica (Rohm & Haas- XAD-4, 2003).

A Figura 2.10 mostra a estrutura química, e a Tabela 2.3 apresenta algumas propriedades físicas da resina Amberlite XAD-4.

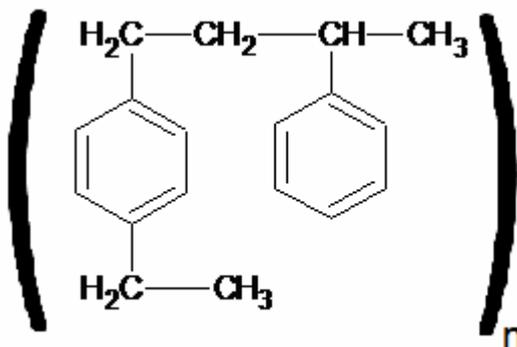


Figura 2.10.: Estrutura química da resina Amberlite XAD-4

2.4.2.2.2 AMBERLITE XAD- 7

A resina Amberlite XAD-7 é um polímero de acrílico e divinilbenzeno, não iônico, alifático e com ligações cruzadas, do qual deriva suas propriedades adsorptivas. Possui estrutura macrorreticular e apresenta-se na forma de esferas brancas insolúveis. Apresenta elevada área superficial e excelente estabilidade física e térmica. Devido sua natureza alifática, o adsorvente polimérico, Amberlite XAD-7, pode adsorver compostos não polares de sistemas aquosos e compostos polares de solventes não polares (Rohm & Haas- XAD-7, 2003). A Figura 2.11 mostra a estrutura química da resina Amberlite XAD-7.

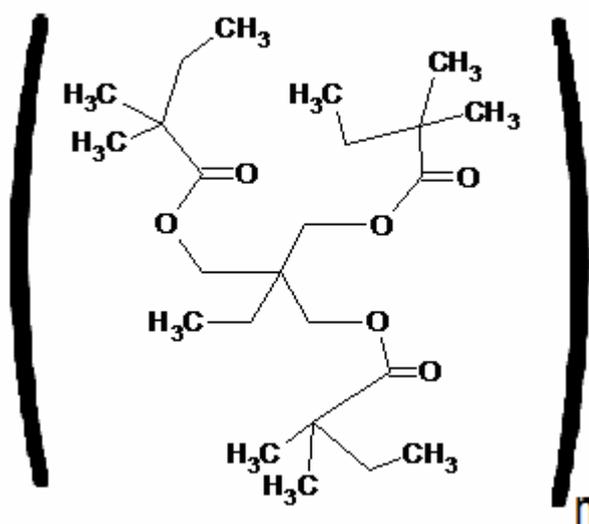


Figura 2.11.: Estrutura química da resina Amberlite XAD-7

2.4.2.2.3 AMBERLITE XAD- 761

A resina Amberlite XAD-761 é um adsorvente fenólico altamente poroso e granular, apresenta-se na forma de esferas de coloração ocre. A presença dos grupos hidroxila fenólico e alcoólico contribui para suas propriedades hidrofílicas (Rohm & Haas- XAD-761, 2004).

A Tabela 2.3 apresenta as propriedades físicas dos adsorventes: Amberlite XAD-4, XAD-7 e XAD-761.

Tabela 2.3.:Propriedades físicas dos adsorventes Amberlite XAD-4 e XAD-7 e XAD-761.

Propriedade	Resinas		
	Amberlite XAD-4#	Amberlite XAD-7##	Amberlite XAD-761###
Polaridade	Hidrofóbica	Intermediária	Hidrofílica
Funcionalidade	Aromática	Acrílica	Fenólica
Forma Física	Grânulos brancos	Esferas brancas insolúveis	Grânulos de coloração ocre
Área superficial (m ² /g)	> 750	> 380	150-250
Diâmetro médio do poro (nm)	5	9	0,6-0,8
Porosidade (mL/mL)	> 0,50	> 0,50	0,95-1,18
Faixa de pH de Trabalho	0,0 – 14,0	0,0 – 14,0	0,0 -8,0
Temperatura máxima(°C)	150	150	40

Porosidade*** = medida por porosímetro de mercúrio

Fontes: ***Bautista *et al*, 1999 # Rohm & Haas Co- XAD4, 2003 ## Rohm & Haas Co XAD-7,2003

Rohm & Haas Co XAD-761,2004

2.4.3 EQUILÍBRIO DE ADSORÇÃO

Adsorção de uma substância de uma fase para a superfície de outra em um sistema específico leva a uma distribuição termodinamicamente definida daquela substância entre as fases quando o sistema alcança o equilíbrio. A maneira comum de representar esta distribuição é expressar a quantidade de substância adsorvida por unidade de massa de adsorvente, q^* , como função da concentração residual de equilíbrio, C^* , da substância remanescente na fase “solução” (Slejko, 1985).

Independente do modelo matemático proposto, uma condição necessária, mas não suficiente, para a descrição adequada da dinâmica de adsorção em colunas de leito fixo é que a relação matemática utilizada (isotermas de adsorção, isotermas de troca iônica, lei de ação das massas) represente apropriadamente os dados de equilíbrio entre as fases na coluna (Ernest *et al*, 1997; Silva *et al*, 2002). Além disso, a primeira etapa num projeto de sistemas consiste na seleção do material adsorvente, cuja avaliação é realizada por meio dos dados experimentais ou relações de equilíbrio.

O estudo do equilíbrio de adsorção, que não corresponde à transferência de massa entre as fases, é usado para determinar a distribuição do adsorbato entre o seio da fase fluida e

da fase adsorvida na superfície do sólido adsorvente. A distribuição de equilíbrio é geralmente medida à temperatura constante, e é referida como isoterma de equilíbrio (Hines *et al*, 1985). O estudo do equilíbrio de adsorção dá informação sobre a capacidade do adsorvente ou a quantidade requerida para remover uma unidade de massa do adsorbato sob as condições do sistema (Aksu *et al*, 2003).

A natureza geral da inclinação ou da zona de transferência de massa da curva de ruptura (perfil de concentração do efluente de uma coluna) é influenciada pela isoterma de equilíbrio, embora a forma do perfil de concentração possa ser significativamente modificada por efeitos cinéticos (Ruthven, 1984).

Para um propósito de avaliar a dinâmica de adsorção, as isotermas são classificadas em (a) favoráveis, (b) linear e (c) desfavorável. A Figura 2.12 mostra estes três tipos de isotermas.

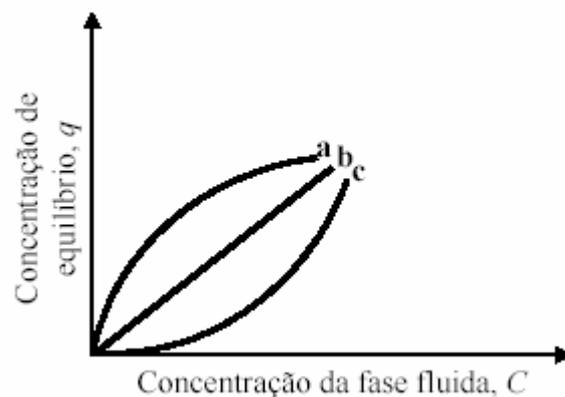


Figura 2.12.: Diagrama das isotermas: (a) favorável, (b) linear e (c) desfavorável

Na maioria dos processos de adsorção, as isotermas são favoráveis e, portanto, a dessorção é desfavorável. Na dessorção, a zona de transferência de massa é dispersiva, conduzindo a uma propagação contínua do perfil de concentração, enquanto que na adsorção, a zona de transferência de massa é compressiva, conduzindo a um comportamento padrão (Ruthven, 1984).

Como na extração, a análise da adsorção está baseada no equilíbrio e nos balanços de massa. A diferença básica é que o equilíbrio não é apresentado como coeficiente de partição, mas sim como uma isoterma de adsorção. Isotermas típicas de adsorção são mostradas na Figura 2.13. Para cada isoterma, a abscissa corresponde à concentração de soluto em solução, geralmente expressa em massa de soluto por volume de solução. A ordenada corresponde à concentração de soluto sobre a superfície adsorvente,

freqüentemente expressa em massa de soluto por massa de adsorvente. As três isotermas mostradas na Figura 2.13 ocorrem em biosseparações (Belter *et al*, 1988).

As isotermas podem ser determinadas no equilíbrio, sendo utilizadas para a seleção de um adsorvente baseado na sua capacidade, ou alternativamente, elas podem ser determinadas como função do tempo, sendo utilizadas para selecionar um adsorvente com base na sua taxa de adsorção (Sleijko, 1985).

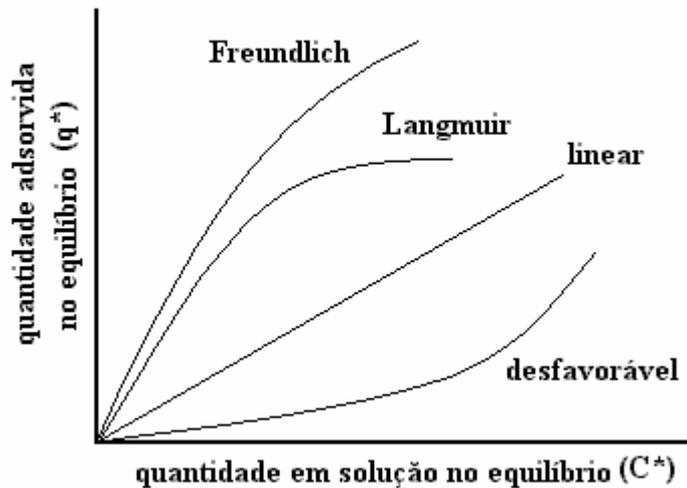


Figura 2.13.: Isotermas comuns de adsorção (Belter *et al*, 1988).

A informação do equilíbrio de adsorção é uma parte muito importante no entendimento do processo de adsorção. Não importa quantos componentes estão presentes no sistema, o equilíbrio de adsorção dos componentes puros é ingrediente essencial para o entendimento de como estes componentes podem ser acomodados pelo sólido adsorvente (Do, 1998).

2.4.3.1 ISOTERMA LINEAR

Em uma adsorção sobre superfície uniforme, onde as concentrações são suficientemente baixas, tal que uma molécula está isolada da molécula vizinha, a relação de equilíbrio entre as concentrações da fase fluida e da fase adsorvida será linear (Ruthven, 1984). Obtém-se assim o modelo de isoterma mais simples, que é o da adsorção linear ou partição constante, que é descrito por uma equação da seguinte forma:

$$q^* = K_H C^* \quad (2.1)$$

onde q^* é a quantidade de soluto adsorvido por quantidade de adsorvente, C^* é a concentração de soluto em solução, e K_H é a constante de equilíbrio (Sleijko, 1985).

Este modelo tem a vantagem de descrever um conjunto de dados de adsorção em termos de um único parâmetro, K_H , e simplificar a modelagem dos dados, já que pode ser resolvido implicitamente para qualquer um dos termos. Todos os demais modelos de isotermas, como por exemplo, os modelos de Freundlich e Langmuir, podem ser reduzidos direta ou indiretamente à relação linear sob condições especiais (Slejko, 1985).

2.4.3.2 ISOTERMA DE LANGMUIR

A isoterma de Langmuir é um modelo teórico, cuja expressão matemática fundamenta-se nas seguintes hipóteses:

- I. Todos os sítios do sólido têm a mesma atividade para a adsorção;
- II. Não existe interação entre as moléculas adsorvidas;
- III. Toda adsorção segue o mesmo mecanismo, e cada complexo adsorvente-adsorbato tem a mesma estrutura;
- IV. A extensão da adsorção não é mais que a formação de uma camada monomolecular sobre a superfície do adsorvente. (Borba, 2006).

A expressão matemática para isoterma de Langmuir para um sistema monocomponente é dada por:

$$q^* = \frac{q_m \times C^*}{K_L + C^*} \quad (2.2)$$

em que q^* é a quantidade adsorvida pela resina no equilíbrio (mg/ g resina), C^* é a concentração de soluto em solução no equilíbrio (mg/ mL), q_m é a capacidade máxima de adsorção da resina (mg/ g resina) e K_L é a constante de adsorção de Langmuir (mg/ mL).

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



K_L , constante de adsorção de Langmuir, é o inverso da constante de equilíbrio, sendo descrita por

$$K_L = \frac{[\text{soluto}][\text{sítios vagos}]}{[\text{sítios preenchidos}]} \quad (2.4)$$

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

$$[\text{sítios totais}] = [\text{sítios vagos}] + [\text{sítios preenchidos}] \quad (2.5)$$

combinando as duas últimas equações temos:

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

Assim, sendo o número de sítios preenchidos proporcional a q^* , a equação 2.6 é equivalente a equação 2.2 (Belter *et al*, 1988).

As constantes da isoterma de Langmuir têm significado físico. O parâmetro K_L representa a razão entre a taxa de adsorção e dessorção. Portanto, baixos valores deste parâmetro indicam forte afinidade do íon pelos sítios do material. O parâmetro qm representa o número total de sítios disponíveis no material adsorvente (Borba, 2006).

Embora derivada para explicar situações de adsorção reversíveis, a equação de Langmuir pode refletir adequadamente sistema de adsorção irreversível e está caracterizada pela formação de monocamada que indica a capacidade de saturação (Ko *et al*, 2001).

2.4.3.3 ISOTERMA DE FREUNDLICH

Ao contrário da forte base teórica apresentada pela isoterma de Langmuir, esta isoterma muitas vezes falha ao descrever dados experimentais adequadamente (Sleijko, 1985). A isoterma de Freundlich não prevê a saturação do adsorvente. Assim, o modelo permite a existência de uma cobertura superficial infinita (Reed *et al*, 1993).

Essa isoterma corresponde à adsorção em sítios não uniformes. Nesse caso o calor de adsorção freqüentemente diminui com o aumento da cobertura na superfície. A falta de uniformidade, todavia, pode ou existir previamente nos diferentes sítios de adsorção ou ser causada pelas forças repulsivas entre átomos ou moléculas adsorvidas. Especialmente no caso da ligação entre a superfície e o adsorbato ser parcialmente iônica, as repulsões podem se tornar grandes, diminuindo notadamente o calor de adsorção em coberturas mais elevadas. A equação 2.7 descreve matematicamente esta isoterma:

$$q^* = K_F C^{*n} \quad (2.7)$$

onde K_F é a constante de equilíbrio de Freundlich (mL/ mg resina) e n é um índice desta isoterma. O índice $1/n$ é indicativo da energia ou intensidade da reação (Sleijko, 1985).

As dimensões de K_F dependem do valor de n , se a adsorção é favorável, então $n < 1$; se esta é desfavorável, então $n > 1$ (Belter *et al*, 1988).

2.4.4 SISTEMAS TÍPICOS DE ADSORÇÃO

As primeiras observações relacionadas ao processo de adsorção foram feitas no século XVIII, contudo é recente o desenvolvimento de tecnologia para aplicação deste fenômeno em processos industriais, como purificação e separação de produtos. O desenvolvimento desta operação foi realizado tomando-se como base a utilização de leitos fixos e fluidizados, colocando-se um sólido adsorvente em contato com uma alimentação fluida (Homem, 2001).

Os processos de separação que utilizam a técnica de adsorção podem ser operados basicamente de duas formas: através de bateladas e em leito fixo.

A maneira pela qual um adsorvente entra em contato com a solução, contendo o soluto a ser adsorvido, é particularmente importante para operações de separação em grande escala. As taxas de adsorção sobre os adsorventes são controladas pelos processos de transporte do soluto até a superfície e dentro dos adsorventes, como pode ser visto na Figura 2.14.

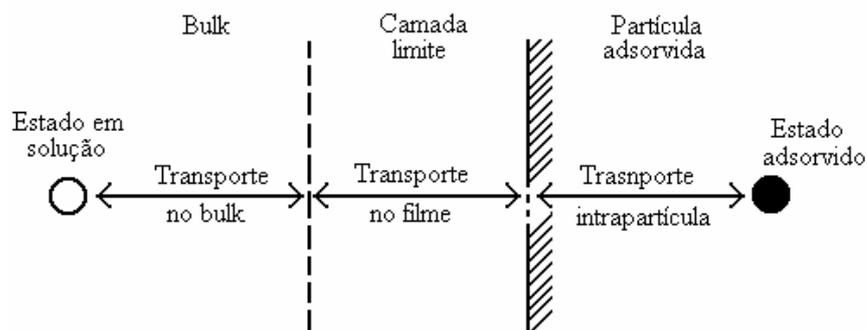


Figura 2.14.: Etapas de transporte de massa na adsorção utilizando adsorventes porosos (Sleijko, 1985).

Os ensaios em batelada são convenientes e informativos para selecionar o tipo de adsorvente ou para otimizar certas condições. Nos experimentos em batelada, os parâmetros a serem examinados incluem a relação massa de adsorvente/volume de solução, pH, temperatura e tempo de contato. Se o composto de interesse tem um ou mais grupos ionizáveis, o pH pode influenciar na capacidade de adsorção do sólido adsorvente. Desta maneira, para adsorção em resinas hidrofóbicas, o pH deveria ser ajustado de tal forma que o composto de interesse não esteja ionizado. É desejável empregar resinas com o menor diâmetro possível, operando em condições eficientes, para permitir que se alcance altas taxas de adsorção. O termo “operação eficiente” é importante; a escolha de um determinado tamanho de resina impõe algumas restrições ao tipo de sistema de reator que

pode ser usado. Adsorventes de alta capacidade, por exemplo, são geralmente utilizados em reatores em batelada ou de mistura (Sleijko, 1985).

2.4.5 RECUPERAÇÃO DE PRODUTOS BIOTECNOLÓGICOS POR ADSORÇÃO EM BATELADA

Prasad *et al* (1980) investigaram o desempenho de quatro trocadores iônicos semelhantes na purificação de estreptomicina através do estudo cinético e o comportamento do equilíbrio de adsorção. Os ensaios em batelada foram realizados com sulfato de estreptomicina em solução aquosa em cada adsorvente separadamente. Os autores observaram que a capacidade de adsorção de estreptomicina nos diferentes trocadores iônicos obedece à seguinte ordem: KB-2 > Indion 236 > IRC-50 > KB4-P2. Também foi observado que não há influência da temperatura no equilíbrio de adsorção dentro da faixa estudada (13 a 23°C) em todos os adsorventes testados.

Boothroyd (1986) descreveu vários métodos de recuperação de cefalosporina C (CPC). Dois estágios são comuns nos processos descritos, a filtração como primeiro estágio de separação sólido-líquido, e o estágio final de purificação que envolve a concentração da CPC através da adsorção de seu núcleo carboxílico em uma resina fracamente básica (IRA-68) e dessorção com acetato de potássio ou acetato de sódio seguido da precipitação da cefalosporina C como sal de potássio ou de sódio, respectivamente. As variações do processo ocorrem na preparação do filtrado para o estágio final. O objetivo desses estágios intermediários é a remoção de todos os íons fortes que possam ser adsorvidos preferencialmente à cefalosporina.

Ghosh *et al* (1996) descreveram processos típicos de purificação de cefalosporina C. O primeiro processo utiliza uma combinação de técnicas de membrana e cromatografia. As células são removidas por microfiltração e proteínas e polissacarídeos são removidos por ultrafiltração. O permeado da ultrafiltração é concentrado por osmose reversa e o antibiótico é finalmente purificado por cromatografia líquida de alto desempenho, obtendo-se uma recuperação acima de 98,5%.

Em outro método, foi sugerido o uso de uma combinação de ultrafiltração, coluna cromatográfica e osmose reversa. A recuperação pode ser maior que 90% através das colunas cromatográficas utilizando resina trocadora de ânions de base fraca (Diaion WA-30), adsorventes poli aromáticos neutros (Diaion HP-20 e Amberlite XAD-2000) e trocadora de cátions de ácido forte (Diaion SK-1B), nessa seqüência. O método de purificação é concluído com a secagem do produto, obtendo-se a cefalosporina na forma

de sal de sódio ou potássio (Ghosh *et al*, 1996). Mais uma vez observa-se que adsorção sempre está presente na purificação de CPC.

Bautista *et al* (1999) desenvolveram um estudo sobre o equilíbrio de adsorção da α -amilase obtida a partir da *Aspergillus oryzae* em duas resinas poliméricas comerciais, uma resina hidrofóbica (Amberlite XAD-761) e uma resina trocadora aniônica (Duolite A-568). Os autores determinaram o efeito do pH, força iônica e temperatura na retenção do adsorbato, estudaram a capacidade de adsorção das resinas e o equilíbrio de adsorção através da obtenção das isotermas de adsorção em diferentes temperaturas. Foi possível concluir que para o sistema hidrofóbico a constante de adsorção aumenta com o aumento da força iônica enquanto que utilizando a resina trocadora de íons o efeito é oposto. Isso ocorre devido a competição entre os sais presentes na fase móvel e os grupos carregados da α -amilase pelos grupos amino da resina trocadora de íons. Em ambos os sistemas a constante de adsorção cresce quando o pH decresce de 8,0 a 6,0. Também foi observado que o equilíbrio de adsorção em diferentes temperaturas mostrou um comportamento não linear para os dois sistemas descritos pela isoterma de Langmuir.

Dutta *et al* (1999) estudaram a adsorção de alguns antibióticos semi-sintéticos (cefadroxil, cefalexina, 6-APA e 7-ACA) em carvão ativado e quatro tipos de resinas poliméricas. Observaram que há grande dependência entre o pH e a quantidade adsorvida. Segundo eles, o fenômeno de adsorção foi determinado por interações hidrofóbicas entre o antibiótico e o adsorvente. Eles concluíram que o carvão ativado é o melhor adsorvente dos antibióticos estudados, porém os estudos foram realizados em meio aquoso.

Barboza *et al* (2000) estudaram a purificação da cefalosporina C, proveniente de caldo de cultivo, 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 fatores na purificação de antibióticos.

Casey *et al* (2007) estudaram a eficácia do uso de resinas para a recuperação da geldanamicina de caldos de fermentação. Foram avaliadas as resinas Amberlite XAD-4, 7, 16, 1180 e 1600, e Sepabeads SP-850 e Diaion HP-20. Todas as resinas avaliadas foram

capazes de recuperar 90% de geldanamicina em uma concentração de 15 g.L⁻¹, sendo seletivas para adsorção de geldanamicina ao invés dos contaminantes.

2.5 DESSORÇÃO

Um dos mais críticos passos nos processos de purificação por adsorção está relacionado à dessorção dos compostos de interesse, com a recuperação ou não do composto adsorvido. A dessorção é normalmente acompanhada pelo uso de condições que resultem em uma significativa queda na afinidade da ligação adsorvente-adsorbato. Uma ótima condição de dessorção é aquela que permite uma completa e efetiva recuperação do adsorbato em volumes relativamente pequenos, enquanto ao mesmo tempo não compromete a atividade química de ambos, adsorvente e adsorbato. A dessorção é normalmente efetuada por mudanças no pH, no potencial iônico, e composição química do tampão (Rehm *et al*, 1993).

Quando o composto alvo é um neutro não ionizável, solventes orgânicos miscíveis em água, como os alcoóis menores, são usados como eluentes. Porém, um tampão aquoso ou mistura tampão/solvente pode ser preferível para compostos ionizáveis (isto é, mais solúveis em água) (Verrall, 1996).

Todas as substâncias orgânicas ou inorgânicas que mudam a polaridade do produto adsorvido, pela formação de sais, ou que possuem uma maior afinidade pela resina são possíveis eluentes. Alguns exemplos são: ácidos, bases, soluções tampão, sais inorgânicos, substâncias orgânicas neutras solúveis em água (alcoóis), solventes orgânicos não miscíveis em água e água (quente, refrigerada) (Voser, 1982).

A escolha da composição do eluente e da sua concentração determina a seletividade, o volume de eluato e se o ácido ou base adsorvido é dessorvido como um sal ou ácido ou base livre. Quando se decide sobre a composição do regenerante, a solubilidade das impurezas e sua afinidade para com a resina devem ser levadas em consideração. Idealmente se espera alcançar 100% de regeneração com um volume mínimo de regenerante. Elevadas temperaturas durante a regeneração podem ser vantajosas (Voser, 1982).

2.6 PLANEJAMENTO ESTATÍSTICO DE EXPERIMENTO

A necessidade crescente da otimização de processos, minimizando custos e tempo, maximizando rendimento, produtividade, pureza e melhor qualidade de produtos levam os

engenheiros de processos, e particularmente os bioquímicos a buscarem técnicas sistemáticas de planejamento de experimentos.

A utilização de experimentos planejados estatisticamente, associada às técnicas de superfície de resposta, tem sido utilizada para a otimização dos processos. O planejamento de experimentos é uma técnica cuja aplicação em processos químicos industriais vem crescendo continuamente, principalmente a partir da década de 80 com a evolução dos microcomputadores e a disponibilidade de “softwares” estatísticos que facilitaram os cálculos e a análise de dados.

O mais importante benefício do planejamento estatístico de experimentos é que ele pode dar mais informações por experimento do que ensaios não planejados, além de reduzir o tempo gasto e melhorar a eficiência das investigações, particularmente quando muitas variáveis são potencialmente importantes. Um segundo benefício é um ensaio organizado através da coleção e análise de informação. Frequentemente as conclusões de um experimento planejado são evidentes, sem análises estatísticas extensivas. Outra vantagem é a certeza de confiabilidade da informação à luz de variação experimental e analítica. Essa análise criteriosa dos resultados, quando apresentados em um trabalho, traz mais credibilidade às conclusões do pesquisador (Staeheli, 1987).

O planejamento dos experimentos, isto é, a especificação detalhada das operações experimentais que devem ser realizadas, dependerá do objetivo particular que ele queira atingir. Cada objetivo irá requerer um planejamento diferente, para que possa ser alcançado de forma eficaz. Um planejamento de experimentos bastante utilizado é o planejamento fatorial de dois níveis, de grande utilidade em investigações preliminares, quando se deseja saber se determinadas variáveis têm ou não influência sobre a resposta, e não se está preocupado ainda com uma descrição muito rigorosa dessa influência. São planejamentos muito simples de executarem e podem ser ampliados para formarem um planejamento mais sofisticado, que é necessário quando se quer conhecer melhor a relação funcional existente entre as respostas e as variáveis. Por outro lado, quando se deseja fazer apenas uma triagem inicial das variáveis, é vantajoso começar pela execução de um planejamento fatorial incompleto, o chamado fatorial fracionário (Box *et al*, 1978).

Através destas técnicas sistemáticas de condução de experimentos é possível avaliar o efeito principal de cada variável na resposta desejada, bem como as interações entre elas. A partir da análise de variância pode-se propor um modelo probabilístico adequado que correlacione as respostas em função das variáveis estudadas, construindo-se a superfície de resposta para determinar as faixas ótimas de operação. Nem sempre o objetivo do

trabalho em estudo é a otimização do processo, mas sim um melhor conhecimento sobre as respostas do sistema frente a variações ou perturbações que podem ocorrer dentro das faixas de operações estabelecidas. Assim, outra informação muito importante que pode ser obtida através do planejamento fatorial é a variação das variáveis que apresentam nenhuma ou pouca influência nas respostas, fornecendo subsídios fundamentais quanto à flexibilidade e robustez do sistema e conseqüentemente na definição da melhor estratégia de controle operacional (Rodrigues *et al*, 1998).

Quando o número de variáveis aumenta, crescem as chances de que uma ou mais variáveis não afetem significativamente a resposta, seja por meio de efeitos principais, seja por meio de efeitos de interação. Então as opções são os planejamentos fatoriais fracionados, que são úteis nas etapas prévias de desenvolvimento de processos. Assim, este procedimento é muito interessante em termos qualitativos, mas não se deve a partir de um planejamento fracionado otimizar o processo, pois os efeitos principais estão confundidos com interações de 2^a e 3^a ordem ou superiores, conforme o tipo de resolução do fracional (Box *et al*, 1987).

A metodologia de superfície de resposta é uma técnica de otimização baseada no emprego de planejamentos fatoriais, introduzida na década de 50, e que desde então tem sido usada com grande sucesso na modelagem de diversos processos industriais (Box *et al*, 1987).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MATERIAIS

Penicilina G potássica, fornecida pela empresa Prodotti S/A; resinas XAD-4, XAD-7 e XAD-761, da Rohm & Haas Co; Carvão Ativado ($d_p < 1,19$ mm), da Synth. Metanol grau HPLC, da Tedia Brazil. Todos os outros reagentes são de grau analítico de diferentes fornecedores.

Penicillium chrysogenum cultivado para obtenção de caldo típico foi doado pela Fundação de Culturas Tropicais.

Escherichia coli ESS, cedida gentilmente pela pesquisadora Paloma Liras (Área de Microbiología, Facultad de Ciencias Biológicas y Ambientales, Universidad de León, León, Spain).

3.2 MÉTODOS

3.2.1 PROCESSO DE PRODUÇÃO DE PENICILINA G

O meio de manutenção para *P. chrysogenum* foi preparado utilizando a técnica de tubo inclinado e era constituído de extrato de malte – 20 g.L^{-1} , peptona – 1 g.L^{-1} , glicose – 20 g.L^{-1} e agar – 20 g.L^{-1} . A cada cinco meses o fungo era transferido desse meio sólido para um outro tubo inclinado com um novo meio de manutenção .

O cultivo do microrganismo iniciou-se com a transferência dos esporos contidos nos tubos com meio de manutenção para um erlenmeyer contendo 100 mL do meio de cultivo composto de: água de maceração de milho – 28 mL.L^{-1} , fosfato de sódio monobásico – $5,2 \text{ g.L}^{-1}$, sulfato de amônio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – $5,2 \text{ g.L}^{-1}$, hidróxido de cálcio $\text{Ca}(\text{OH})_2$ – $1,2 \text{ g.L}^{-1}$, carbonato de cálcio CaCO_3 – $0,8 \text{ g.L}^{-1}$, polipropileno 2000 (antiespumante) – $2,6 \text{ mL.L}^{-1}$, água – 800 mL.L^{-1} e sacarose – 10 g.L^{-1} .

O erlenmeyer, contendo a suspensão de esporos para germinação, foi mantido em agitação (250 rpm), a 25°C por 24 horas. Em seguida o caldo de cultivo resultante foi distribuído em erlenmeyers contendo meio de cultivo fresco, no qual se adicionou o precursor para a produção de penG (fenilacetato de potássio – $2,56 \text{ g.L}^{-1}$).

Após 24 horas, o caldo de cultivo era filtrado à vácuo com papel filtro qualitativo (de diâmetro 7,0 cm) para remoção da massa de fungos e o filtrado era armazenado a -20°C .

3.2.2 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE PENG

Para a determinação da concentração de penG foi utilizada a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), o método iodométrico, o bioensaio e a hidrólise enzimática de penG.

3.2.2.1 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)

A análise de penG em meio aquoso foi realizada utilizando a técnica CLAE, empregando-se uma coluna C-18, μ BondPack, 3,9x 300mm e fase móvel 20% acetonitrila, 80% tampão fosfato 10mM, pH 6,5, tiosulfato de sódio 10mM em uma vazão de 1 mL/min, com detecção UV a 254nm usando-se o cromatógrafo da marca Shimadzu modelo CLASS-LC10. Ao utilizar o cromatógrafo modelo CLASS-VP, alterou-se a fase móvel para 25% metanol e 75% água deionizada, excluindo a existência de sal na fase móvel.

A concentração de penG em amostras foi calculada a partir de uma curva de calibração (Área pico X Concentração penG), a qual foi preparada utilizando como solvente, água ou caldo de cultivo livre de penG. As curvas de calibração e as equações obtidas são apresentadas nas Figuras 3.1 e 3.2.

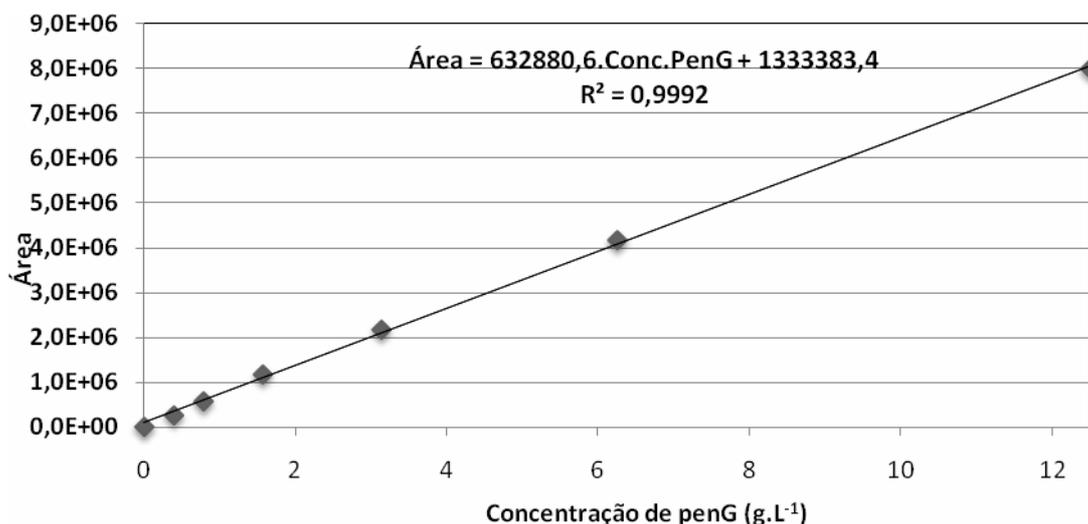


Figura 3.1.: Curva de calibração de penicilina G em água utilizando o cromatógrafo modelo CLASS - LC10

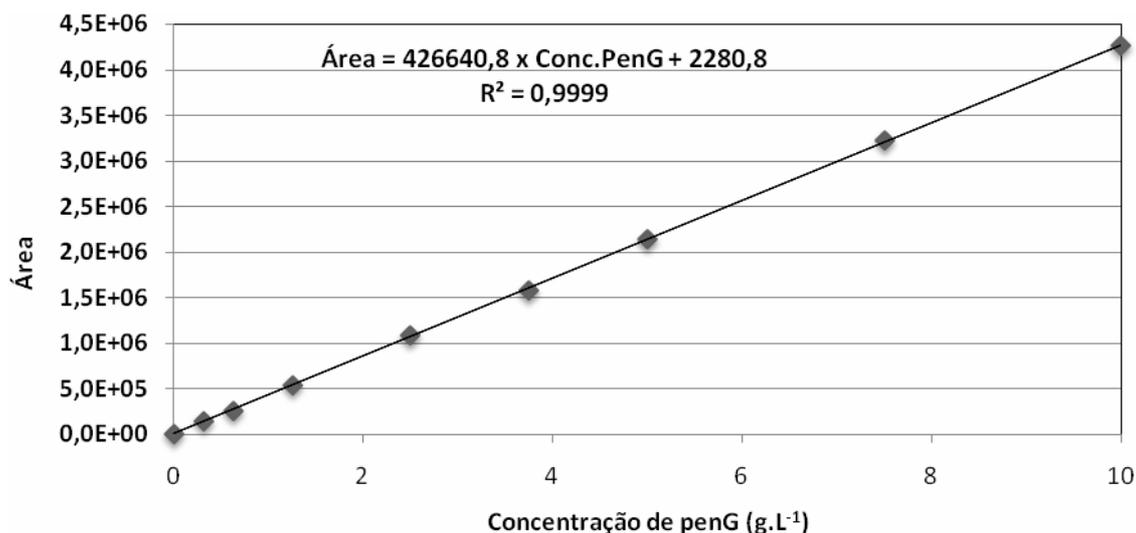


Figura 3.2.: Curva de calibração de penicilina G em caldo de cultivo utilizando o cromatógrafo modelo CLASS VP

3.2.2.2 MÉTODO IODOMÉTRICO

A determinação da concentração de penG pelo método iodométrico foi realizada empregando-se uma seqüência de reações com a penG. Primeiramente, uma solução contendo penG (2mL) foi misturada com 2 mL de NaOH 1N por 15 minutos com a finalidade de romper o anel β -lactâmico produzindo o ácido penicilínico. Neutralizou-se a solução com 2 mL de HCl 1,2N. Adicionou-se um excesso de solução de iodo 0,01N (10mL). Após 15 minutos reagindo, o iodo não consumido foi titulado com tiosulfato de sódio 0,01N (USP 26, 2003).

3.2.2.3 BIOENSAIO

Para a realização dos bioensaios utilizou-se a *Escherichea coli* ESS, bactéria sensível a antibiótico β -lactâmico. A bactéria foi cultivada em meio agar nutriente (5 g.L⁻¹ de peptona, 3 g.L⁻¹ de extrato de carne, 20 g.L⁻¹ de agar e 100mL de água destilada, com pH ajustado em 7,2), por 48 horas em estufa a 36- 37 °C.

Para suspender os microrganismos utilizados no bioensaio, adicionaram-se 10 mL de solução salina (0,9% m/v) para cada tubo contendo bactérias cultivadas em 20 mL de agar nutriente inclinado. A densidade optica (OD) da suspensão resultante foi lida a um comprimento de onde de 600 nm, em espectrofotômetro.

A suspensão obtida foi misturada ao meio agar nutriente de tal forma que 1 mL da solução com OD₆₀₀ igual a 1 fosse adicionado a 100 mL de agar. Nessa parte do procedimento, tomou-se o cuidado de controlar a temperatura do agar de tal forma que ela não fosse muito alta para matar o microrganismo e ao mesmo tempo não tão frio para não solidificar o agar.

Após a mistura, alíquotas de 20 mL de agar foram despejadas em placas de Petri com 150 mm de diâmetro, previamente esterilizadas.

Após solidificação do meio, perfurou-se o número necessário de poços de 5 mm de diâmetro, nos quais foram adicionados 20 µL das soluções preparadas de amostra ou de padrão de antibiótico, adequadamente diluídas.

As placas foram incubadas a 36-37°C por 24 horas, medindo-se, então, os diâmetros dos halos de inibição.

3.2.2.4 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE PENG

Para a hidrólise, a amostra contendo penG foi diluída em tampão fosfato 100mM pH 9,0 em proporção 1:1. Um milímetro dessa solução foi adicionado a um microtubo de capacidade de 1,5 mL o qual foi mantido fechado em um banho termostatizado a 37°C em repouso. A essa mistura, adicionou-se 50 µL da solução de PGA (5U), e a reação ocorreu durante 20 minutos formando 6-APA. Para a determinação da concentração de 6-APA em solução foi usado o método PDAB – Balasinghan *et al* (1972). Assim, ao fim da hidrólise, uma alíquota de 25 µL foi transferida a uma cubeta de capacidade de 4mL contendo 2,5mL de p-dimetilaminobenzaldeído (PDAB). Após 2,5 minutos, a amostra foi analisada em espectrofotômetro (marca PHARMACIA BIOTECH modelo Ultrospec 2000) a 415nm e a absorbância foi determinada.

3.2.3 DETERMINAÇÃO DA SOLUBILIDADE DE PENG EM DIFERENTES SOLUÇÕES

A solubilidade da penG em diferentes soluções foi determinada seguindo o método de Gude *et al*,1996. Os ensaios foram realizados a temperatura constante, 8°C em frascos de 100 mL. As amostras foram preparadas gravimetricamente, ou seja, eram adicionadas massas conhecidas de penG até a percepção de formação de precipitado. Os frascos foram lacrados e então eram colocados em uma mesa incubadora rotativa (“shaker”), sob agitação suave (100 rpm). Todas as amostras foram agitadas por pelo menos 4 horas e em

seguida as suspensões foram deixadas para sedimentar. Após a sedimentação, amostras do sobrenadante foram retiradas por meio de uma seringa acoplada a um filtro de 0,2 μ m, evitando a passagem de sólidos. Após essa etapa, as amostras foram analisadas por cromatografia de alta eficiência (CLAE).

3.2.4 DETERMINAÇÃO DA ESTABILIDADE DE PENG FRENTE A pH E TEMPERATURA

Os experimentos de determinação da estabilidade foram realizados em batelada. Não foi utilizado tampão, ou seja, os valores de pH foram ajustados apenas no início de cada experimento. Ajustou-se o pH (nos valores pré-determinados) de 100 mL de água destilada (a 4°C e 12°C) e adicionou-se 0,3g de penG obtendo-se uma solução 3 g.L⁻¹ e ajustou-se novamente o pH. Essa solução foi colocada em agitação com temperatura controlada. Coletaram-se amostras no decorrer do tempo e essas foram diluídas em tampão fosfato 100 mM pH 7,0 (1:1) para interromper a degradação e a concentração residual de penG foi determinada através de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Os testes de estabilidade foram realizados em meio aquoso e em triplicata.

3.2.5 ENSAIOS DE ADSORÇÃO EM BATELADA

3.2.5.1 TRATAMENTO DOS ADSORVENTES

Inicialmente, as resinas XAD foram pré-tratadas com metanol, etanol e água destilada. Para cada grama de resina, foram adicionados 2 mL de metanol e a mistura foi mantida sob agitação por 30 minutos. Em seguida, a resina foi separada por filtração a vácuo e o procedimento foi repetido duas vezes. A resina tratada com metanol foi lavada com água destilada e seca em estufa a 50°C por 24 h. Em seguida, a resina passou por um processo de hidratação utilizando etanol e água. 100 mL de etanol foram mantidos em contato com a resina até que não fosse observadas bolhas de ar no etanol, indicando que o volume interno das partículas do adsorvente estava totalmente preenchido pelo solvente. Em seguida, o etanol foi substituído por água destilada e a resina foi lavada abundantemente com água destilada em sistema de filtração a vácuo.

3.2.5.2 EFICIÊNCIA DE ADSORÇÃO DE PENG: SELEÇÃO DE RESINA

Para os estudos de eficiência de adsorção, utilizou-se 0,25g (em base seca) de adsorvente pré-tratado (XAD-4, XAD-7, XAD-761 e carvão ativado) para 5 mL de caldo de cultivo de concentração de penG de 50 g.L⁻¹, temperatura de 4°C, e pH de 6,0; 5,0 e

4,0. Determinou-se a concentração de penG no sobrenadante depois de 45 minutos de adsorção (amostrando-se com filtro de tamanho de corte de 0,45 μm) sob agitação. A eficiência de adsorção foi calculada por meio da relação percentual entre a concentração inicial e a final de penicilina na solução, conforme mostrado na Equação 3.1.

$$\%EA = \frac{(C_o - C^*)}{C_o} * 100 \quad (3.1)$$

onde C^* é a quantidade de equilíbrio em solução do composto e C_o é a concentração inicial do mesmo. Assim, uma eficiência de adsorção de 50% expressa que 50% da concentração inicial do composto foi adsorvida pela resina.

3.2.5.3 DETERMINAÇÃO DO TEMPO DE EQUILÍBRIO - CINÉTICA DE ADSORÇÃO

Para cinética de adsorção, utilizou-se 0,1 g (em base seca) de XAD-4 pré-tratada para 2mL de caldo de cultivo com 50 g.L^{-1} de penG, temperatura de 4 °C e 12 °C, e valores de pH de 4,0; 5,0 e 7,0. Retiraram-se amostras do sobrenadante nos tempos 0, 2, 4, 6, 10, 20, 30, 45 e 60 minutos. Quando a concentração de penG em solução era constante, o equilíbrio era alcançado. A concentração de penG na amostra foi determinada por hidrólise enzimática.

3.2.5.4 ISOTERMAS DE EQUILÍBRIO

Para isoterma de adsorção, utilizou-se 0,1 g (em base seca) de adsorvente pré-tratado para 2mL de caldo de cultivo com diferentes valores de concentração de penG, temperatura entre 4 e 12°C, e valores de pH entre 4,0 e 7,0. Determinou-se a concentração de penG no sobrenadante depois de atingido o equilíbrio de adsorção. As concentrações de equilíbrio na resina, q^* , foram determinadas pelo balanço de massa, utilizando a Equação 3.2:

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

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

Com os dados de q^* e C^* , é possível estabelecer qual modelo da literatura (Linear, Langmuir e Freundlich – Equações 2.1, 2.2 e 2.7, respectivamente) representa a cinética de adsorção na resina escolhida para extração de penG.

3.2.5.5 ENSAIOS DE ADSORÇÃO DE PENICILINA G

Para promover uma máxima adsorção de penG, optou-se pela análise de dois métodos de adsorção: o uso ou não de gradiente de pH durante o processo.

No caso da adsorção sem gradiente, o pH da solução de penG em contato com a resina foi vagarosamente ajustado até o valor de 4,0, a fim de evitar degradação pontual da penG. Com o gradiente, a solução de penG em pH 7,0 é mantida em contato com a resina por 45 minutos, até atingir o equilíbrio de adsorção. Em seguida o pH é ajustado para 5,0, novamente por 45 minutos. Esse procedimento foi repetido reduzindo-se o valor de pH até completa adsorção de penG. Entretanto, para valores baixos de pH (3,0, 2,5 e 2,0), o procedimento respeitou o tempo que o antibiótico não degradava.

Esses experimentos de adsorção foram realizados a 4°C com agitação mecânica (agitador sem pá) e o pH foi ajustado para os valores desejados utilizando titulador automático (marca METROHM modelo 718 STAT Titrino).

3.2.6 ENSAIOS DE DESSORÇÃO EM BATELADA

A resina contendo penG adsorvida foi filtrada para separação do sobrenadante e colocada em contato com eluente a diferentes valores de pH, temperaturas e composição de mistura água/etanol conforme o planejamento fatorial. Amostras foram retiradas com filtro para determinação da concentração de penG. Esses experimentos de dessorção foram realizados em mesa incubadora rotativa com agitação de 250 rpm.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 ESTUDO DA QUANTIFICAÇÃO DE PENICILINA GEM MEIO DE CULTIVO

4.1.1 COMPARAÇÃO ENTRE MÉTODOS JÁ UTILIZADOS

Várias metodologias são conhecidas e utilizadas para a determinação de penG. Entre elas destacam-se: cromatografia líquida, bioensaio, titulação iodométrica ou mercuriométrica e alguns métodos espectrofotométricos baseados na reação de penG com hidroxilamina ou imidazole (Grime, 1979; Zhu, 1997). Cada um destes métodos apresenta vantagens e desvantagens, e a aplicação desses métodos depende fortemente do tipo de meio que contém a molécula de interesse.

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é uma das técnicas mais utilizada para determinação de penG. Apesar de apresentar vantagens como elevada reprodutibilidade e precisão, a análise de penG em meios complexos como o caldo de cultivo pode gerar rápida perda de eficiência da coluna, devido ao contato de inúmeras moléculas contaminantes com a fase estacionária.

Muitas vezes, a baixa sensibilidade (em 254nm) do experimento, associado ao baixo nível de concentração de penG numa amostra de caldo, exige que um grande volume desta seja injetado no sistema para atingir níveis detectáveis do analito de interesse, aumentando assim, o risco de perda de eficiência da coluna cromatográfica devido ligações irreversíveis que podem ocorrer entre os contaminantes e a fase estacionária.

Uma maneira de minimizar danos à coluna é realizar uma reação de derivatização da penG para aumentar a sensibilidade do método e reduzir a quantidade de amostra injetada. Entretanto, as reações de derivatização envolvem o uso de reagentes tóxicos e exigem maior tempo de análise.

Neste trabalho, um método cromatográfico sem derivatização, descrito em detalhes no item 3.2.2.1 foi utilizado como método de referência para confirmar a concentração de penG em algumas amostras, as quais foram anteriormente analisadas por métodos alternativos.

Um dos métodos investigado e implementado, com vistas a minimizar danos ao sistema de cromatografia foi o método iodométrico, descrito em detalhes no 3.2.2.2. Este foi desenvolvido por Alicino, 1940, e há vários anos é utilizado para quantificar penicilina em muitos produtos formulados, derivados e amostras de caldo de cultivo adequadamente

tratados (Alicino, 1961). Nesse método, penG reage com iodo e o excesso deste é quantificado. Apesar de ser uma metodologia simples e de baixo custo, a análise de penG, com baixo grau de pureza, apresenta alguns obstáculos. Por exemplo, muitas outras substâncias presentes no meio podem consumir o iodo, resultando assim na determinação de uma concentração aparente de penG. Além disso, variações na resposta podem ocorrer em função da temperatura, tempo, pH e concentração de iodo (Grime, 1979).

O bioensaio, método descrito em detalhes no item 3.2.2.3, é um teste de determinação da concentração de penG ativa no meio. Neste método, bactéria sabidamente sensível a penicilina G é cultivada em placa onde se perfuram poços para adição de amostras ou soluções padrão de penG. O halo de inibição de crescimento é proporcional à concentração de penG, o menor halo corresponde a uma menor concentração de penG. Contudo, é um método pouco exato e o mais trabalhoso, embora seja também um teste que garante não só haver penG no meio, mas também que ela está realmente desempenhando a função esperada.

Investigou-se inicialmente a eficiência do método iodométrico na quantificação de penG em caldo de cultivo, preparando-se 50 mL de uma solução padrão de penG 50g.L⁻¹ em tampão fosfato 100mM, pH 7,0. Alíquotas dessa solução foram analisadas pelo método cromatográfico, iodométrico e bioensaio.

Em seguida, 25 mL da solução de penG 50g.L⁻¹ foi submetida à inativação a 37°C pela adição de 25mg de penicilinase (enzima que hidrolisa o anel β-lactâmico). Alíquotas desta solução foram retiradas após 30 e 60 min de hidrólise e foram analisadas pelos três métodos. As concentrações determinadas em cada método são apresentadas na Tabela 4.1.

Tabela 4.1.: Teste comparativo entre os métodos para quantificar penicilinaG. Amostras: (1) solução de penG sem a hidrólise por penicilinase, (2) solução de penG na mesma concentração hidrolisada por penicilinase por 30 min e (3) solução de penG na mesma concentração hidrolisada por penicilinase por 60 min. Condições de diluição com tampão fosfato 100mM: 1:500 (bioensaio), 1:4 (iodometria) e 1:1 (CLAE).

	CLAE	M. Iodométrico	Bioensaio
	C (g.L ⁻¹)	C (g.L ⁻¹)	D _{HALO} (cm)
PenG 50g/L	49,14	63,08	5,50
PenG 50g/L hidrólise-30 min	43,12	60,84	4,90
PenG 50g/L hidrólise-60 min	43,18	59,16	4,80
% Hidrolisada	12,13	6,21	12,73

Observou-se que o percentual de redução na concentração de penG ativa determinada por CLAE é semelhante a estimativa do percentual hidrolisada obtida no bioensaio. Entretanto, este percentual é menor quando se utiliza o método iodométrico. Estes resultados indicam que não é possível diferenciar as formas ativas e degradadas de penG

pelo método iodométrico. Além disso, o longo tempo de análise dessa metodologia nos incentivou a buscar novas estratégias para quantificar penG na forma intacta de maneira simples e rápida.

4.1.2 DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO ENZIMÁTICO PARA A QUANTIFICAÇÃO DE PENG

A medida de atividade da enzima penicilina G acilase produzida durante o cultivo de *Bacillus megaterium*, quantificando-se espectrofotometricamente o produto da hidrólise de penicilina G catalisada pela enzima é metodologia amplamente utilizada no grupo de Engenharia de Processos Enzimáticos do DEQ/UFSCar. Nesse método, ácido 6-aminopenicilânico (6-APA) gerado na reação reage com dimetilaminobenzaldeído (PDAB), gerando bases de Schiff coloridas. Baseando-se nessa metodologia, o método desenvolvido neste trabalho consiste na hidrólise completa da penG presente na amostra catalisada por penicilina G acilase (PGA) livre (solúvel), quantificando-se 6-APA produzido com PDAB. Como mostrado na Figura 2.3, para cada mol de penG hidrolisada, um mol de 6-APA é liberado.

Esse método foi também comparado com análise CLAE. Os resultados obtidos, mostrados na Tabela 4.2, indicam que as concentrações obtidas através do método enzimático estão de acordo com os valores de concentração obtidos para as mesmas amostras analisadas por CLAE.

Tabela 4.2.: Estudo comparativo CLAE x Hidrólise enzimática

Conc. Teórica de penG (g.L ⁻¹)	CLAE	Hidrólise Enzimática
	Conc. de penG (g.L ⁻¹)	Conc de penG (g.L ⁻¹)
50,00	49,65	48,85
25,00	23,56	26,11
12,50	13,21	12,27
6,25	6,21	6,34

A obtenção da curva de calibração utilizando como solvente o caldo de cultivo, o uso de excesso de enzima no meio e sua especificidade, garantem a boa reprodutibilidade e exatidão nas medidas realizadas. Assim, a hidrólise enzimática, associada à quantificação do 6-APA através de reação com PDAB (Balasinghan, 1972), foi utilizada neste trabalho de maneira satisfatória, visto que penG em diferentes meios e em ampla faixa de concentração foi determinada com exatidão e precisão.

Como pode ser observado na Figura 4.1, o ajuste linear apresenta correlação excelente, demonstrando que a curva de calibração pode ser aplicada dentro da faixa de concentração utilizada.

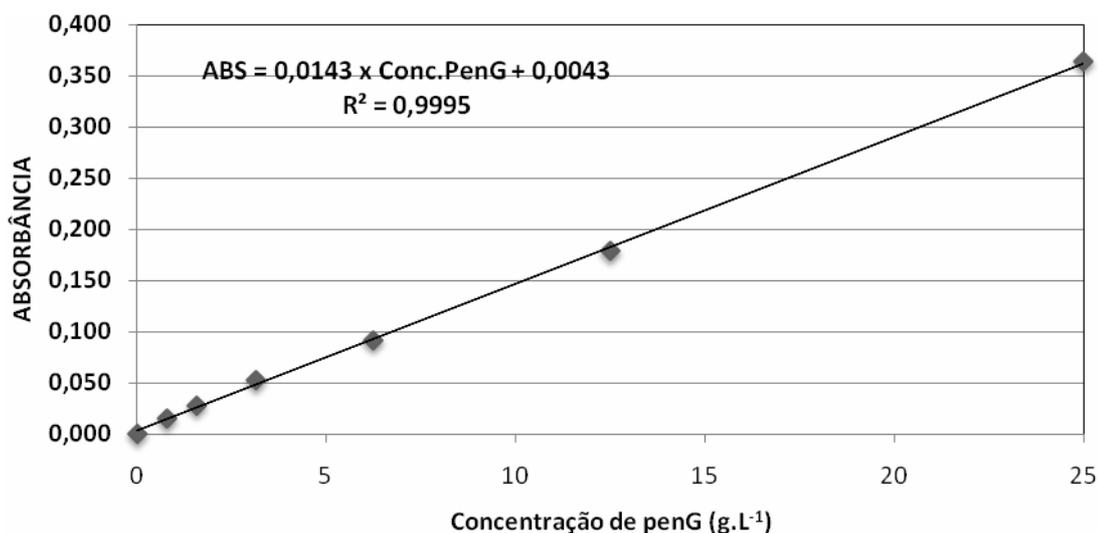


Figura 4.1.: Curva de calibração de penicilina G utilizando a hidrólise de penG

4.2 INFLUÊNCIA DA COMPOSIÇÃO (TEMPO DE CULTIVO) DO MEIO DE CULTIVO NA ANÁLISE CROMATOGRÁFICA DE PENICILINA G

As características do caldo de cultivo variam com o tempo de cultivo devido à liberação de vários compostos orgânicos, os quais podem interferir na análise da penG. A análise deste efeito é importante para o estudo de adsorção de penG em diferentes concentrações, visto que esta concentração também está associada ao tempo de cultivo.

Assim, inicialmente, foram realizados experimentos para caracterizar caldos de cultivos obtidos em diferentes tempos com o objetivo de monitorar o surgimento de interferentes na análise de penG. Esse efeito foi investigado adicionando-se quantidades conhecidas de penG a caldos de cultivo obtidos em diferentes tempos e analisando-se por cromatografia líquida de alta eficiência, as respostas obtidas (áreas dos picos correspondentes a concentrações conhecidas de penG) para as mesmas concentrações nos diferentes meios de cultivos. Foram analisados caldos de cultivos obtidos em 24, 48 e 120 h (Figura 4.2). Os resultados mostram que não há variações significativas dos coeficientes angulares das curvas que correlacionam linearmente área de pico em função da concentração de penG, para os diferentes tempos de cultivo analisados.

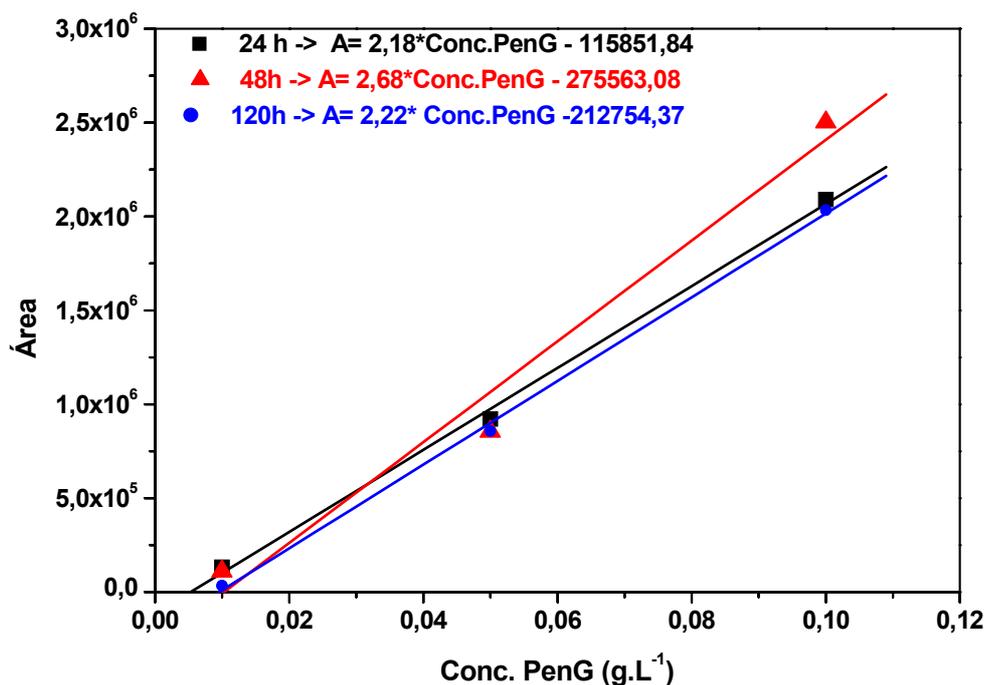


Figura 4.2.:Curvas de calibração para quantificar penG presente em caldo de cultivo obtido com diferentes tempos. Análise em HPLC, coluna C-18, μ BondPack, 3,9x 300mm e fase móvel 20% acetonitrila, 80% tampão fosfato 10mM, pH 6,5, tiossulfato de sódio 10mM em uma vazão de 1 mL.min⁻¹.

Os resultados apresentados na Figura 4.2 indicam que uma única curva de calibração pode ser utilizada para analisar caldos de cultivos obtidos em diferentes tempos, pois os compostos orgânicos liberados não interferem significativamente na quantificação de penG.

O objetivo principal neste trabalho é investigar a eficiência de adsorção de penG em diferentes resinas hidrofóbicas. A partir dos resultados obtidos anteriormente observa-se que as condições de análise já estão bem estabelecidas. Entretanto, ainda se faz necessário definir os intervalos de pH e temperatura em que a molécula de interesse (penG) é estável. Em seguida, dentro deste intervalo, estabelecer qual a melhor resina, a melhor temperatura e o melhor pH para adsorção de penG .

Portanto, a próxima etapa deste trabalho foi estudar a estabilidade de penG em diferentes temperaturas e pH.

4.3 TESTES DE ESTABILIDADE DA PENICILINA G EM MEIO AQUOSO

A degradação da penG em uma solução aquosa é devido à dissociação do grupo carboxil que transforma penicilina ativa em produtos inativos, tais como o ácido penicílico (Hersbach *et al*, 1984).

As temperaturas típicas usadas industrialmente na estocagem da penG, enquanto aguarda separação do microorganismo, e na extração com solvente estão em torno de 12°C e 4°C, respectivamente. Assim, os ensaios de adsorção e estabilidade da penG foram realizados nessas duas temperaturas (Kheirloomoom *et al*, 1999).

Quanto mais ácido o pH, menos ionizada estará a penG e, portanto, maior deverá ser a sua afinidade pela resina hidrofóbica, conforme observou Vieira *et al* (2003) para ampicilina. É por essa razão que, também na indústria, a extração líquido-líquido com solvente hidrofóbico é feita no valor de pH entre 2-2,5. Torna-se importante, então, estudar a estabilidade de penG a valores de pH ácidos e assim foram realizados testes de estabilidade a pH variando de 2,0 a 7,0.

Os gráficos apresentados na Figura 4.3 mostram os resultados dos experimentos de estabilidade de penG em diferentes valores de pH a 4°C. A linha azul indica o tempo máximo em que não se observa perda, por degradação, da penG.

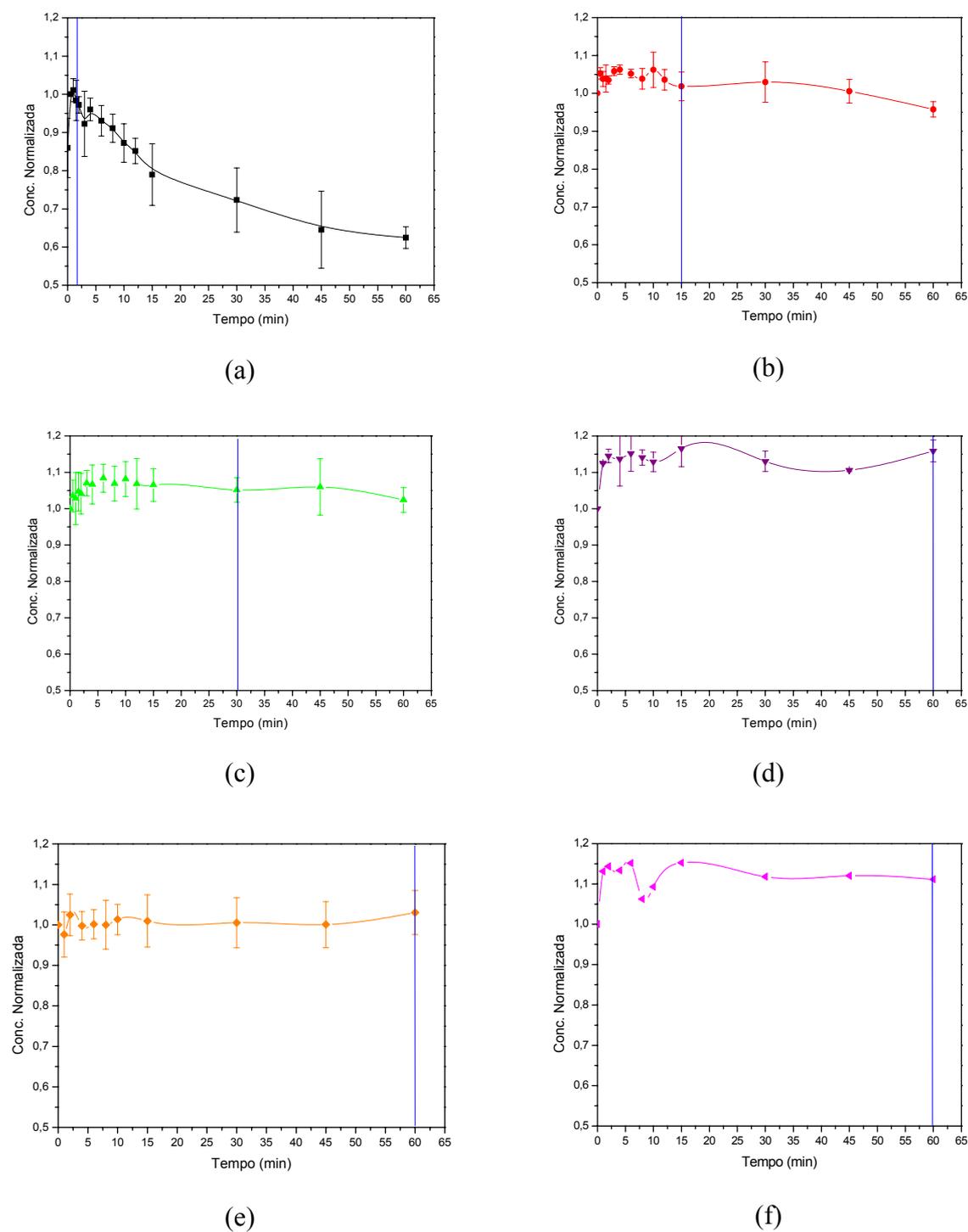


Figura 4.3.: Gráfico da estabilidade de PenG a 4°C em diferentes valores de pH (a) 2,0 (b) 2,5, (c) 3,0, (d) 4,0, (e) 5,0, (f)7,0.

Os resultados obtidos mostram que penG não se degrada entre valores de pH de 4,0 a 7,0 durante os 60 minutos de ensaio. Para pH 2,0, observou-se rápida degradação de penG e uma degradação mais lenta em pH 3,0. Entretanto, como economicamente é mais interessante trabalhar com temperaturas mais altas, realizou-se o estudo da estabilidade em

diferentes valores de pH a 12°C. Os gráficos apresentados na Figura 4.4 mostram esses resultados.

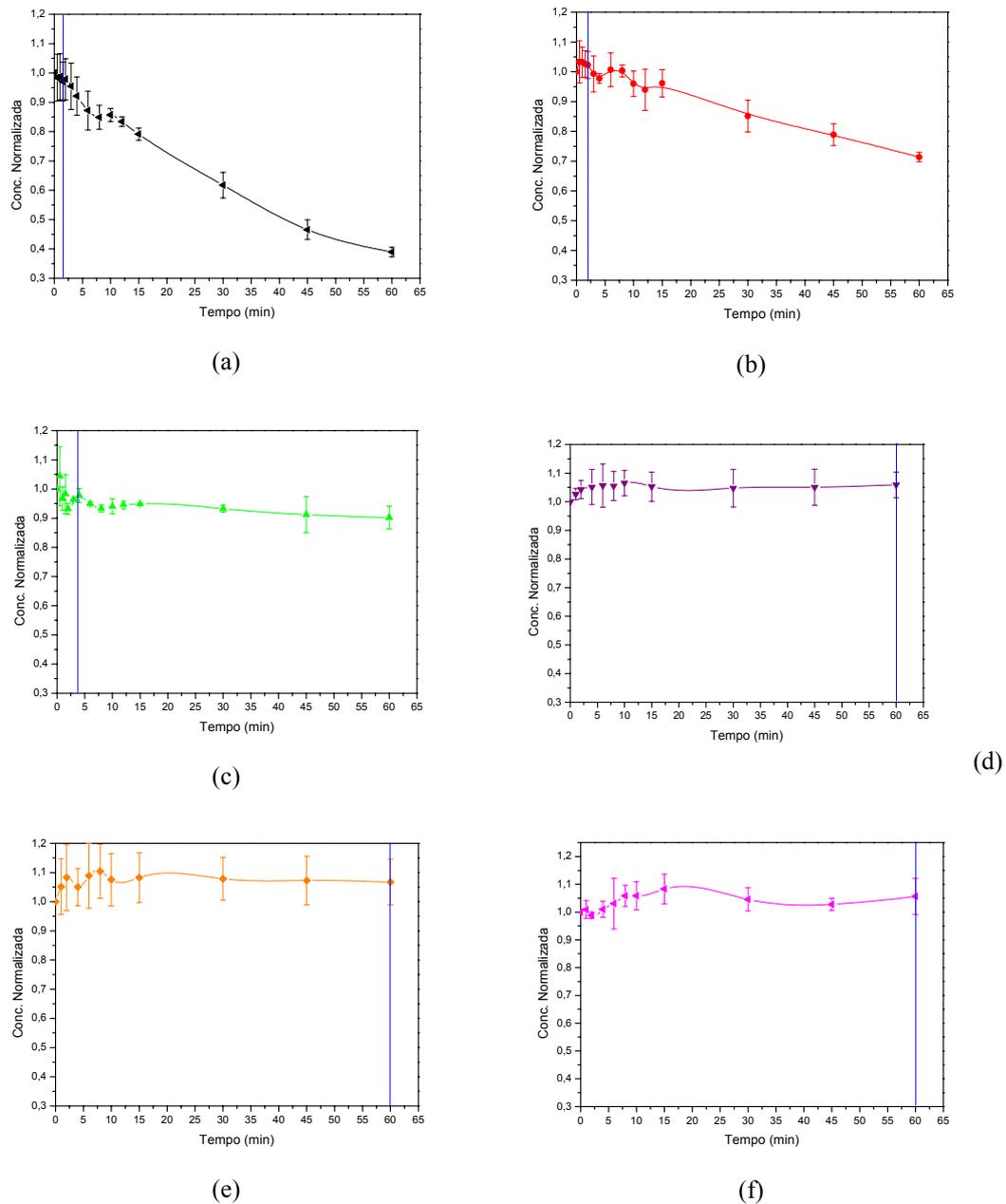


Figura 4.4.: Gráfico da estabilidade de PenG a 12°C em diferentes valores de pH (a) 2,0 (b) 2,5, (c) 3,0, (d) 4,0, (e) 5,0, (f)7,0.

Durante o isolamento da penG, 10-15% do produto são perdidos e manter a integridade da molécula é importante para a redução de tais perdas (Kheirloom *et al*, 1999). Portanto, neste trabalho foram determinados os intervalos de tempo em que não ocorre degradação de penG em valores de pH específicos.

Os tempos que a penG pode permanecer em solução com diferentes valores de pH a 4°C e 12°C sem que se observe degradação, estão apresentados na Tabela 4.3.

Tabela 4.3.: Dados de estabilidade de PenG frente a pH

<i>T</i> (°C) \ <i>pH</i>	2	2,5	3	4	5	7
4	2 min	15 min	30 min	1 h	1 h	1 h
12	2 min	2 min	4 min	1 h	1 h	1 h

Após estimar a estabilidade de penG em diferentes valores de pH, seguiu-se a etapa de adsorção em diferentes resinas XAD e carvão ativado.

4.4 EFICIÊNCIA DE DIFERENTES ADSORVENTES NA SEPARAÇÃO DE PENICILINA G EM DIFERENTES VALORES DE pH

Dutta *et al* (1999) estudaram a adsorção de antibióticos β -lactâmicos em carvão ativado e resinas poliméricas. Observaram que há grande dependência entre o pH e a quantidade adsorvida. Segundo eles, o fenômeno de adsorção foi determinado por interações hidrofóbicas entre o antibiótico e o adsorvente. No entanto, esses estudos foram realizados em meio aquoso.

Atualmente, na indústria, o processo de purificação de penG pode envolver uma etapa utilizando carvão ativado para a remoção de impurezas presentes no caldo de cultivo. Uma vez que essa etapa é realizada na indústria acreditava-se que ela não deveria implicar grandes perdas de penG. Foram realizados experimentos preparando-se soluções 50 g.L⁻¹ de penG utilizando como solvente água ou caldo de cultivo para avaliar o efeito das impurezas na eficiência de adsorção de penG em carvão ativado.

As condições utilizadas neste experimento foram pH 6,0, temperatura de 4°C, concentração de penG de 50 g.L⁻¹, 1 hora de adsorção e 0,1g do carvão ativado (previamente tratado) em 5 mL de caldo de cultivo. Em pH 6,0 penG está praticamente toda ionizada (99,9%) e não deverá ter grande afinidade pelo carvão ativado.

A Figura 4.5 apresenta os resultados de adsorção em carvão ativado.

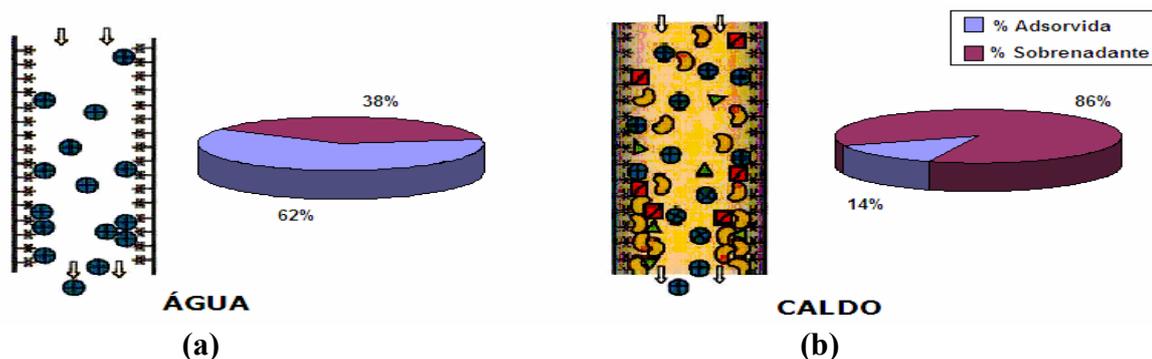


Figura 4.5.: Esquema da Adsorção em Carvão Ativado e gráfico da quantidade de penG adsorvida, em meio aquoso (a) e em caldo (b)

Observou-se que, para uma mesma massa de penG adicionada à água ou caldo de cultivo, uma quantidade bem maior de penG dissolvida em água (aproximadamente 62%) é adsorvida em carvão ativado, enquanto somente 14 % de penG presente em caldo de cultivo é adsorvida. Assim, mesmo com a competição dos demais componentes do caldo de cultivo pelo adsorvente e a presença de um grupo ácido ionizado na penG, ainda se observa uma razoável adsorção do antibiótico. Considerando-se esses resultados, decidiu-se não incluir a adsorção em carvão ativado para a retirada de impurezas do caldo, mas, o carvão ativado será utilizado como um adsorvente na continuidade do estudo.

Passou-se a seguir a testes de adsorção em diferentes resinas XAD e carvão ativado, visando selecionar qual tinha maior eficiência de adsorção de penG. A Figura 4.6 mostra os resultados obtidos no teste de adsorção de penG em diferentes adsorventes em pH 6,0 e temperatura de 4°C.

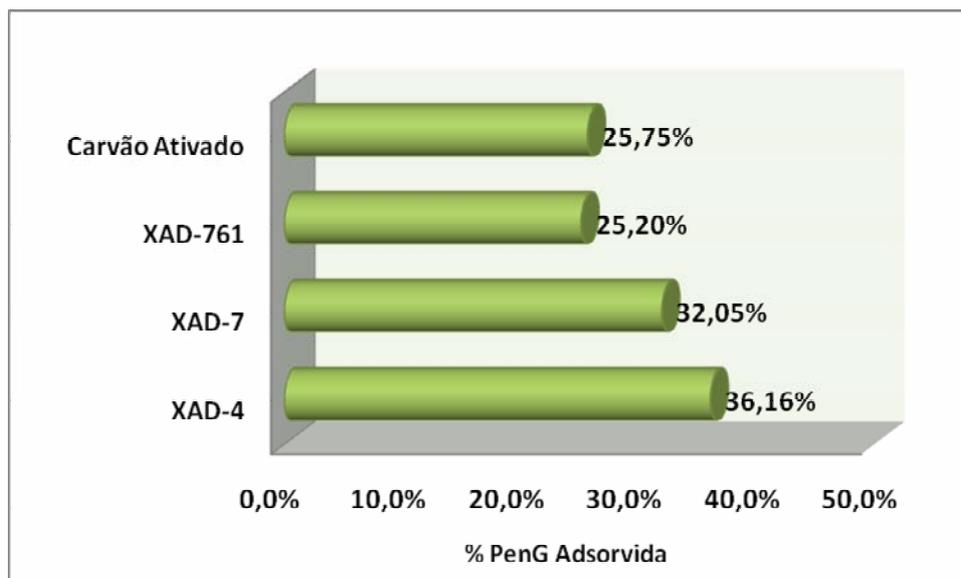


Figura 4.6.: Gráfico da adsorção de penG em XAD-4, XAD-7, XAD-761 e carvão ativado, a 4°C, pH 6,0, 1h, utilizando 0,25g (em base seca) de adsorvente pré-tratado para 5 mL de caldo de cultivo contendo 50 g.L⁻¹ de penG.

Esse teste mostrou que a maior eficiência de adsorção, aproximadamente 36% de penG presente no caldo, foi obtida com XAD-4.

Visando confirmar os resultados iniciais, que apontam XAD-4 como melhor resina, foram determinadas as eficiências de adsorção de penG a pH 4,0 e 5,0, utilizando as mesmas condições do experimento anterior. As Figuras 4.7 e 4.8 mostram os resultados obtidos no teste de adsorção de penG em diferentes adsorventes, temperatura de 4°C, pH 4,0 e pH 5,0, respectivamente.

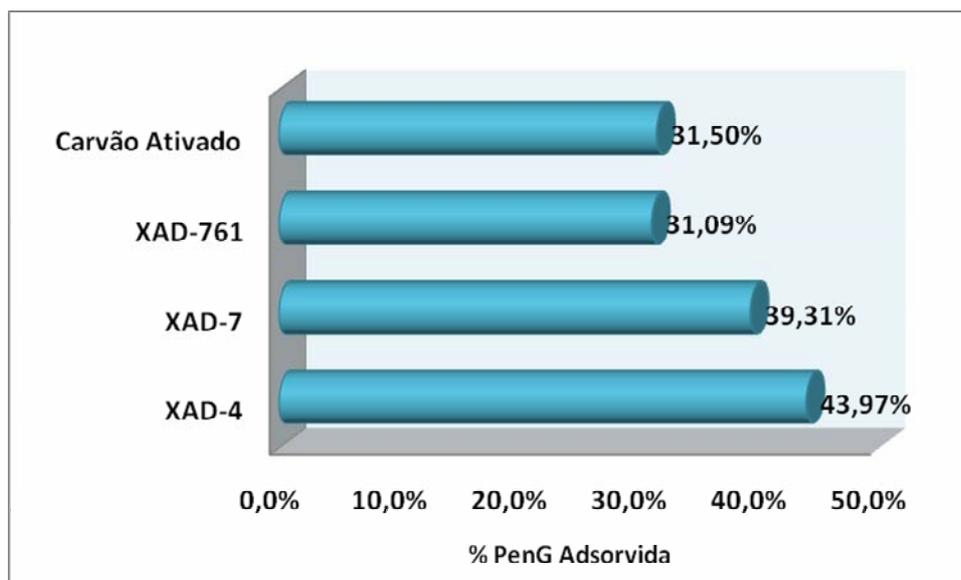


Figura 4.7.: Gráfico da adsorção de penG em XAD-4, XAD-7, XAD-761 e carvão ativado, a 4°C, pH 4,0, 1h, utilizando 0,25g (em base seca) de adsorvente pré-tratado para 5 mL de caldo de cultivo contendo 50 g.L⁻¹ de penG.

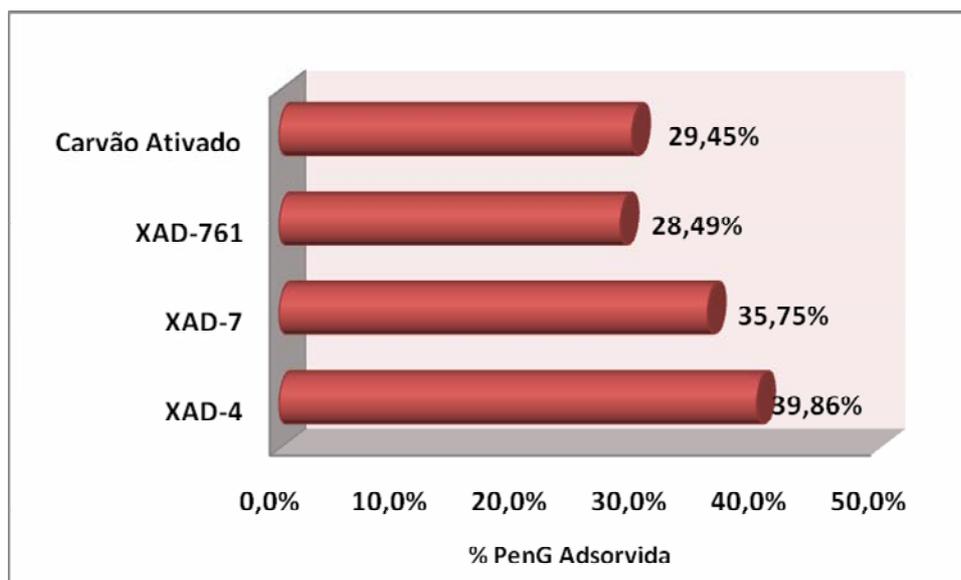


Figura 4.8.: Gráfico da adsorção de penG em XAD-4, XAD-7, XAD-761 e carvão ativado, a 4°C, pH 5,0, 1h, utilizando 0,25g (em base seca) de adsorvente pré-tratado para 5 mL de caldo de cultivo contendo 50 g.L⁻¹ de penG.

Conforme pode ser observado na Figura 4.9, não houve alteração significativa na eficiência de adsorção em qualquer resina utilizada com o pH. Essa alteração foi em torno de 8% ao longo da faixa de pH estudada utilizando a resina XAD-4, enquanto que a alteração foi em torno de 7%, 6% e 6% utilizando XAD-7, XAD-761 e carvão ativado, respectivamente.

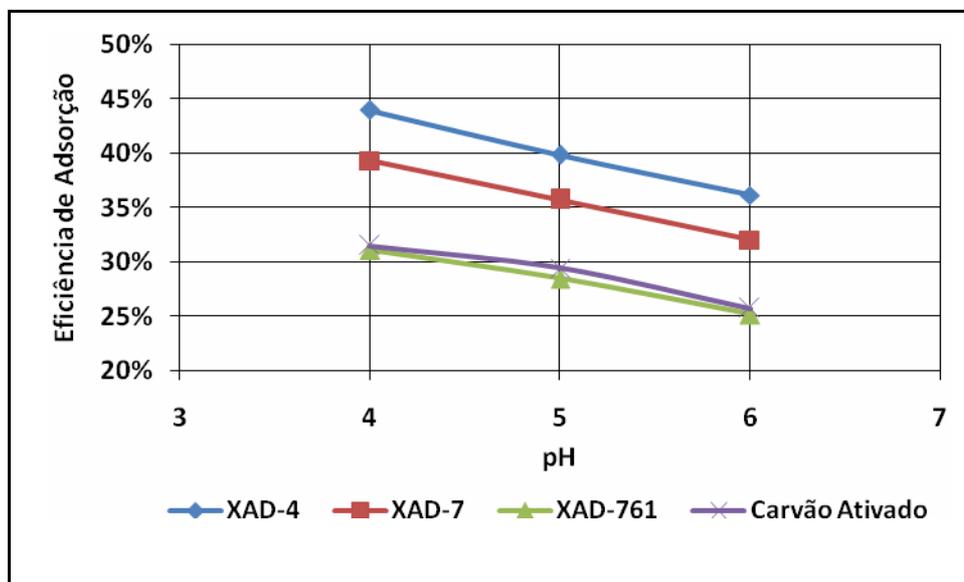


Figura 4.9.: Efeito do pH sobre a eficiência de adsorção

Ainda, penG não mostrou alteração no padrão de adsorção para as diferentes resinas nos três valores de pH testados. Observou-se que nos três valores de pH estudados, a porcentagem de penG adsorvida é maior na XAD-4 seguida da XAD-7, carvão ativado e XAD-761. Esses resultados indicam, pois Amberlite XAD-4 como melhor adsorvente, a qual foi, portanto selecionada para uso em todo restante do trabalho.

Dutta *et al* (1999) afirmam que o carvão ativado é o melhor adsorvente de alguns antibióticos β lactâmicos (como cefalexina, cefadroxil e 6-APA). No entanto, os estudos foram realizados em meio aquoso. Como mostrado anteriormente, penG é altamente adsorvida em carvão ativado quando em meio aquoso, como mostrado na Figura 4.5. Entretanto, isso não foi observado na adsorção de penG em caldo de cultivo, devido à competição entre impurezas e penG.

Após estimar o melhor adsorvente a ser utilizado no trabalho, procurou-se estudar a cinética de adsorção, visando também estabelecer o tempo de contato necessário para garantir que o equilíbrio fosse alcançado.

4.5 DETERMINAÇÃO DO TEMPO DE EQUILÍBRIO - CINÉTICA DE ADSORÇÃO

O tempo necessário para se atingir o equilíbrio depende da velocidade de adsorção, portanto da afinidade entre a matriz e a penG, e da temperatura de adsorção. O fenômeno está ilustrado na Figuras 4.10 (a) e (b), que apresentam os resultados a 4°C e 12°C, respectivamente.

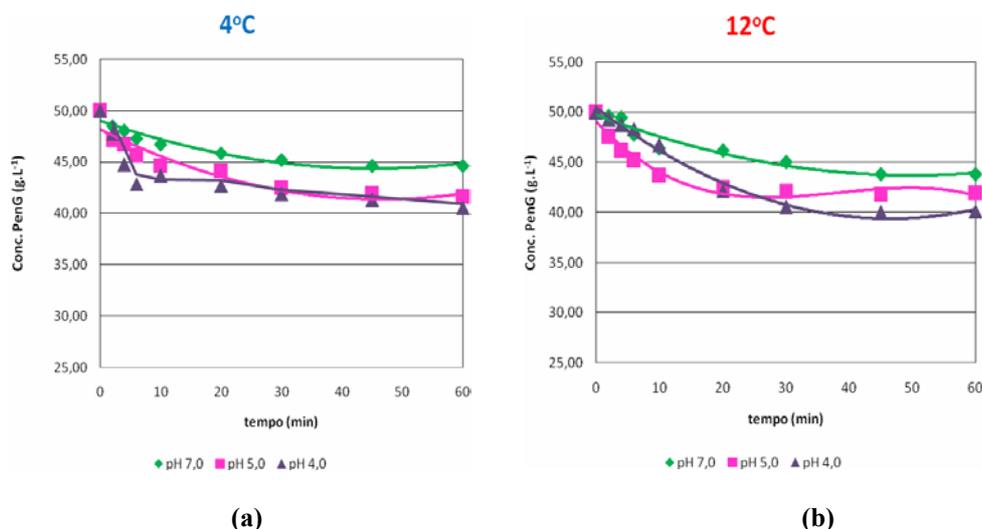


Figura 4.10.: Cinética de Adsorção (a) 4°C e (b) 12°C, utilizando-se 0,1 g (em base seca) de XAD-4 pré-tratada para 2 mL de caldo de cultivo de concentração de penG de 50 g.L⁻¹ em valores de pH 4,0; 5,0 e 7,0.

O pH e temperatura são variáveis importantes no estudo de adsorção. Sabe-se que em valores de pH mais ácidos, a penG encontra-se mais em sua forma neutra e assim facilita sua adsorção na resina. Isso pode ser comprovado nos ensaios de cinética, que mostrou uma menor concentração de penG em pH 4,0 quando atingido o equilíbrio.

Sabe-se que a adsorção é exotérmica e o equilíbrio assim deverá ser favorecido a baixas temperaturas. Como se pode observar nos gráficos da Figura 4.10, nas duas temperaturas estudadas não observou diferenças no tempo de equilíbrio. Em 4°C, a adsorção foi levemente mais lenta ao comparada os resultados em 12°C.

A comparação entre os tempos de contato obtidos em ambas as temperaturas mostra que o estado de equilíbrio foi atingido com 45 minutos. Optou-se assim pela continuidade do estudo com tempo de contato de 45 minutos.

4.6 ISOTERMAS DE ADSORÇÃO

A determinação da isoterma de equilíbrio é importante para se determinar a capacidade máxima de adsorção da resina, bem como o valor da sua afinidade. A faixa de

concentração no estudo em questão foi estabelecida considerando-se dados de produção industrial, que relatam se atingir valores de até 50 g.L^{-1} de penG no caldo de cultivo. Usou-se assim a faixa entre 5 e 50 g.L^{-1} . Como o perfil cinético dos ensaios para a determinação do modelo cinético foram semelhantes nos diferentes valores de pH, optou-se por determinar as isotermas de adsorção nas duas temperaturas (4 e 12°C) em apenas dois valores de pH ($4,0$ e $7,0$).

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

Tabela 4.4.: Resultados experimentais obtidos na determinação da isoterma de equilíbrio para penG utilizando XAD-4, em pH 4 e 7 e temperatura 4°C e 12°C , utilizando $0,1 \text{ g}$ (em base seca) de XAD-4 pré-tratado para 2 mL de caldo de cultivo.

Co (mg/mL)	4°C				12°C			
	pH 7,0		pH 4,0		pH 7,0		pH 4,0	
	C* (mg/mL)	q* (mg penG/ g resina)	C* (mg/mL)	q* (mg penG/ g resina)	C* (mg/mL)	q* (mg penG/ g resina)	C* (mg/mL)	q* (mg penG/ g resina)
50	33,03	339,40	32,73	345,48	33,27	334,52	32,18	356,44
40	24,97	300,60	23,82	323,56	24,23	315,34	22,32	353,70
30	16,89	262,20	16,48	270,43	16,01	279,73	14,10	318,08
25	14,48	210,43	14,24	215,21	13,28	234,38	12,39	252,19
20	9,82	203,60	10,67	186,54	10,47	190,55	8,01	239,86
15	8,48	130,43	8,42	131,64	6,43	171,37	6,23	175,48
10	4,77	104,60	4,77	104,68	3,83	123,42	2,87	142,60
5	2,82	43,56	2,41	51,86	1,50	70,00	1,36	72,74
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

A Figura 4.11 apresenta os resultados obtidos da isoterma de adsorção de penG em XAD-4 através da técnica descrita anteriormente.

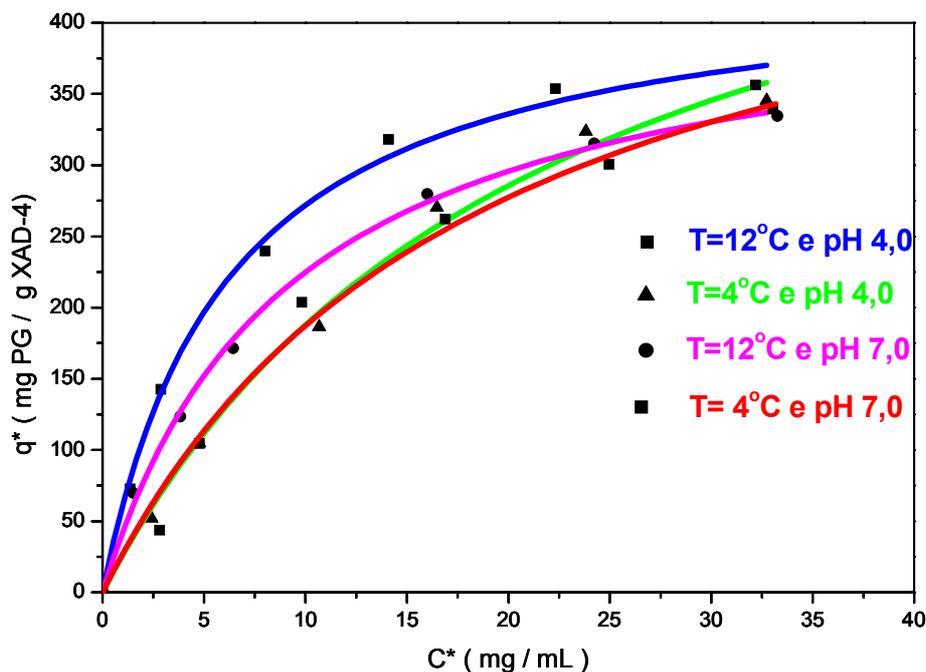


Figura 4.11.: Isotermas de Adsorção- Modelo de Langmuir, utilizando 0,1 g (em base seca) de XAD-4 pré-tratado para 2mL de caldo de cultivo.

Analisando-se os coeficientes aparentes de correlação apresentados na Tabela 4.5, pode-se observar que o modelo de Langmuir apresenta um ajuste significativamente melhor aos pontos experimentais. Assim, pode-se determinar a máxima capacidade e a constante de adsorção de penG em XAD-4 nas diferentes combinações de valores de pH e temperatura.

Tabela 4.5.: Parâmetros Aparentes de Ajuste dos modelos de Langmuir, Freundlich e Linear para a penG e seus coeficientes de correlação.

pH	T(°C)	Langmuir			Freundlich			Linear	
		q_m (mg/g)	K_L (mg/mL)	R^2	n	K_F (mL/mg resina)	R^2	K_P (mg/mL)	R^2
4	4	595,06±51,54	21,67±3,64	0,9942	0,615±0,075	43,42±10,15	0,968	10,81±1,41	0,960
7	4	534,68±56,36	18,55±4,06	0,9885	0,593±0,089	44,79±12,42	0,950	10,14±1,51	0,940
4	12	439,84±14,82	6,17±0,66	0,9958	0,401±0,067	97,39±19,29	0,935	10,48±2,45	0,886
7	12	431,72±11,34	9,19±0,67	0,9981	0,458±0,046	71,41±10,13	0,980	9,45±1,65	0,930

Os resultados apresentados nas Tabelas 4.4 e 4.5 indicam que a adsorção é mais eficiente quando realizada a pH 4,0 e 4°C. Era esperado que a pH 4,0, a eficiência de adsorção apresentasse resultados significativamente melhores que a pH 7,0, visto que à

medida que diminui o pH aumenta a concentração da forma neutra, que deverá ter maior afinidade pela resina. Entretanto, observa-se que a diferença entre os valores de concentrações de penG na forma neutra (valores calculados na Tabela 4.6) a pH 4,0 e pH 7,0, é muito baixa, o que explica a pouca variação observada na eficiência de adsorção. Um efeito significativo do pH na adsorção de penG em resina hidrofóbica só seria observado para valores de pH em torno de 2,74. Além disso, a adsorção de penG contida em uma matriz complexa (caldo de cultivo) deve considerar o efeito do pH não somente sobre a penG, mas também sobre todas as moléculas existentes neste meio, as quais também competirão pelos sítios de adsorção.

Por outro lado, acredita-se que a forma ionizada da penG pode interagir com XAD-4 através de sua cadeia lateral hidrofóbica, ao contrário do que se observa na extração utilizando solvente hidrofóbico, onde somente a forma neutra é extraída.

Tabela 4.6.: Porcentagem de penG na sua forma neutra e iônica em diferentes valores de pH.

pH	Forma Neutra (HA)	Forma Iônica (A ⁻)	pH	Forma Neutra (HA)	Forma Iônica (A ⁻)
1	98,21%	1,79%	6	0,05%	99,95%
2	84,60%	15,40%	7	0,01%	99,99%
2,74	50,00%	50,00%	8	~0,0%	~100,00%
3	35,46%	64,54%	9	~0,0%	~100,00%
3,2	25,75%	74,25%	10	~0,0%	~100,00%
3,5	14,81%	85,19%	11	~0,0%	~100,00%
4	5,21%	94,79%	12	~0,0%	~100,00%
5	0,55%	99,45%	13	~0,0%	~100,00%

Analisando os valores da capacidade máxima na mesma temperatura, os resultados apresentados nas Tabelas 4.4 e 4.5 indicam que a adsorção é mais eficiente quando realizada a temperaturas menores.

Além da complexidade do meio, também devem ser considerados os erros associados ao ajuste do modelo de Langmuir, devido principalmente, à correlação dos parâmetros dificultar a percepção do efeito do pH e da temperatura na adsorção de penG, já que os valores de K_L e q_{max} podem variar de uma forma que se compensem. Foi possível, entretanto, determinar as condições experimentais mais adequadas à adsorção, dando suporte às etapas seguintes deste estudo.

Para efeito comparativo, foi importante estudar a isoterma de equilíbrio de penG em água deionizada para se determinar a real capacidade máxima de adsorção de penG pela resina, sem a competição com as impurezas do caldo. A faixa de concentração no estudo

em questão foi igual ao do estudo com caldo de cultivo. Por apresentar melhores condições de adsorção, optou-se por determinar a isoterma de adsorção em 4°C e pH 4,0.

Os resultados experimentais utilizados na determinação da isoterma de equilíbrio para a penG utilizando resina XAD-4 são apresentados na Tabela 4.7.

Tabela 4.7.: Resultados experimentais obtidos na determinação da isoterma de equilíbrio para penG utilizando XAD-4, em pH 4 e temperatura 4°C, utilizando 0,1 g (em base seca) de XAD-4 pré-tratado para 2mL de água deionizada.

		4°C	
		pH 4,0	
Co (mg/mL)	C* (mg/mL)	q* (mg penG/ g resina)	
50	27,81	472,40	
40	19,23	469,48	
30	10,04	378,50	
20	6,66	295,80	
10	2,99	136,00	
0	0,00	0,00	

A Figura 4.12 apresenta os resultados obtidos da isoterma de adsorção de penG em XAD-4 através da técnica descrita anteriormente.

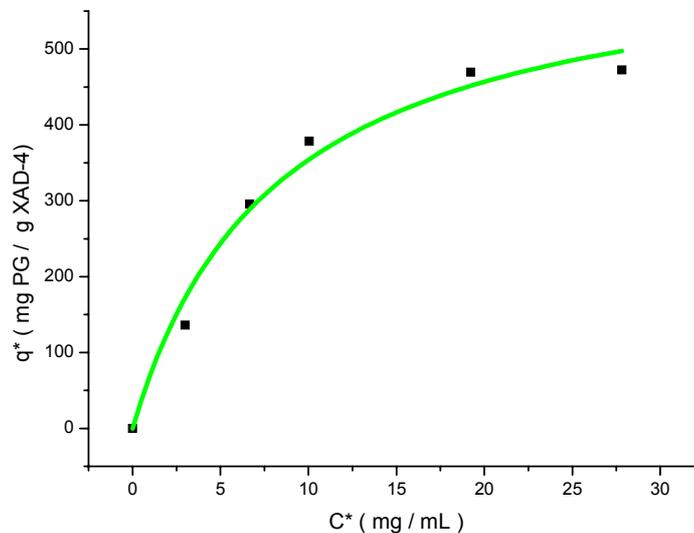


Figura 4.12.: Isotermas de Adsorção- Modelo de Langmuir, utilizando 0,1 g (em base seca) de XAD-4 pré-tratado para 2mL de água deionizada.

A Tabela 4.8 apresenta a máxima capacidade e a constante de adsorção de penG em XAD-4 em 4°C e pH 4,0 utilizando água deionizada.

Tabela 4.8.: Parâmetros Aparentes de Ajuste dos modelos de Langmuir para a penG e seus coeficientes de correlação.

		Langmuir		
pH	T(°C)	qm (mg/g)	K _L (mg/mL)	R ²
4	4	644,21±56,58	8,20±1,91	0,9841

Os resultados apresentados nas Tabelas 4.5 e 4.8 indicam que XAD-4, a 4°C e pH4, tem capacidade de adsorção de penG dissolvida em água similar à apresentada quando penG estava dissolvida no meio de cultivo, o que indica que a resina tem alta seletividade por penG.

Conhecendo a estabilidade da penG em diferentes valores de pH e temperatura, as propriedades físico-química da resina escolhida e a interação entre penG e resina pode-se iniciar o estudo de adsorção da penG em Amberlite XAD-4.

4.7 ESTRATÉGIAS DE ADSORÇÃO DE PENICILINA G

4.7.1 DESENVOLVIMENTO DO PROCESSO DE ADSORÇÃO DE PENICILINA G COM GRADIENTE DE pH

Em valores de pH mais ácidos, penG é pouco solúvel e apresenta baixa estabilidade. Entretanto, essa condição é importante para promover melhor adsorção desse antibiótico em resinas hidrofóbicas. Foi impossível se determinar isotermas de adsorção a valores de pH menores que 4, pois para valores altos de concentração, em pH menor que 4,0, o antibiótico tem forte tendência a formar polímeros. Visando estudar a adsorção em valores de pH baixos, minimizando perdas de penG por degradação, optou-se pelo uso de gradiente de pH durante a adsorção.

O processo iniciou-se em pH 7,0 e conservou-se nesse pH durante 45 minutos. A seguir, o pH foi ajustado para 5,0, no qual permaneceu por mais 45 minutos, depois para 4,0, mantido por mais 45 minutos. Em seguida, o pH foi ajustado para 3,0 e permaneceu por 30 minutos, quando foi novamente ajustado para pH 2,5 por 15 minutos. Retiraram-se amostras ao final de cada tempo, antes da mudança de pH. Com essa estratégia, ao se diminuir o pH, a concentração de penG no meio já estaria menor, pois parte dela já estaria adsorvida, o que possibilitaria a adsorção em pH mais ácido.

A adsorção em sistema de gradiente de pH foi realizada mantendo uma solução sob agitação mecânica em banho a uma temperatura de 4°C.

Para aumentar a eficiência na adsorção, optou-se em aumentar a quantidade de resina durante o gradiente de adsorção, simulando uma operação em coluna com ajuste de pH

entre estágios. Nesse teste, a adsorção iniciou-se com 0,5 g de XAD-4 e a cada mudança de pH adicionou-se mais 0,5 g, totalizando 2 g de resina em 40 mL de uma solução 50 g.L⁻¹. Alíquotas do sobrenadante foram retiradas e a concentração de penG foi monitorada ao longo do tempo em todos os valores de pH. Os resultados obtidos nesse ensaio estão apresentados na Figura 4.13.

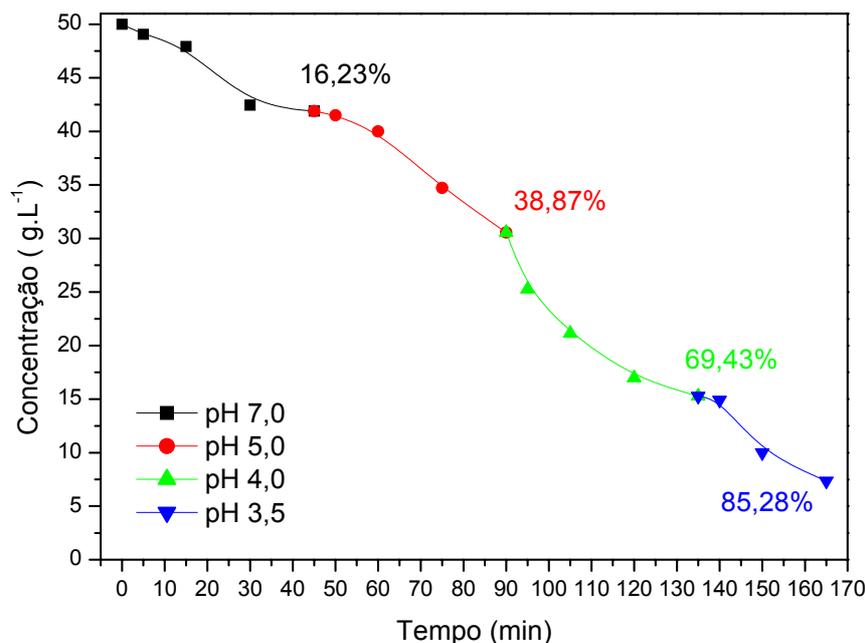


Figura 4.13.: Resultados da adsorção de penG a 4°C na faixa de pH de 3,5 a 7,0 utilizando 2 g de XAD-4 adicionados gradativamente em 40mL de caldo com 50g.L⁻¹ de penG

Considerando que em processo de separação de penG por extração com solvente, ocorrem perdas entre 10 – 15% (Kheirilomoom *et al*, 1999), podemos considerar o processo de adsorção adequado para a recuperação de penG. Contudo, devido às perdas que podem ocorrer durante a dessorção, decidiu-se fazer um novo experimento usando uma redução ainda maior do pH, visando atingir adsorção máxima.

Para aumentar a recuperação de penG a partir do caldo de cultivo, o mesmo processo anterior foi realizado seguido da diminuição do pH de 3,5 para 3,2 sem adição de nova quantidade de resina. Os resultados obtidos estão apresentados na Figura 4.14.

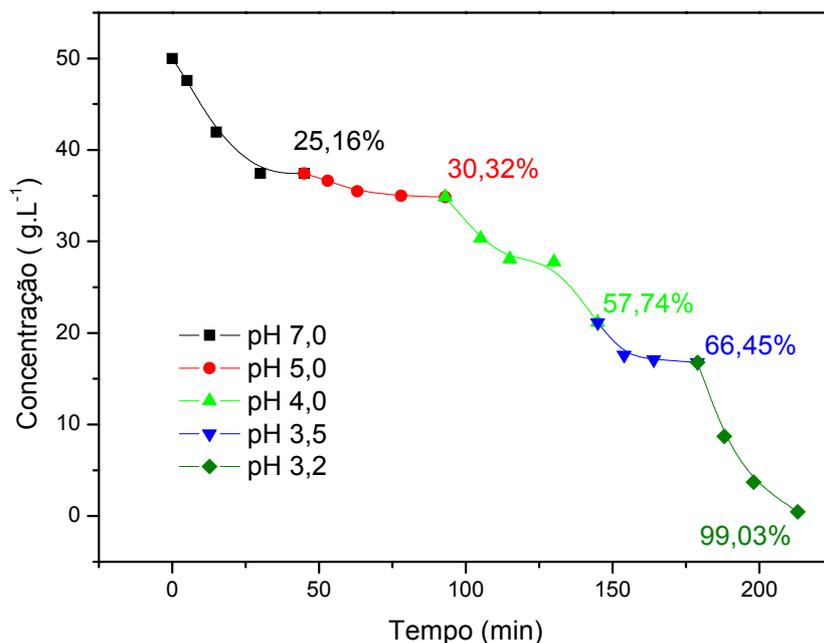


Figura 4.14.: Resultados da adsorção de penG a 4°C na faixa de pH de 3,2 a 7,0 utilizando 2 g de XAD-4 adicionado gradativamente em 40 mL de caldo com 50 g.L⁻¹ de penG

Analisando-se os resultados obtidos no segundo experimento de adsorção com gradiente, quando se reduziu o pH de 7,0 para 4,0, conseguiu-se adsorver 0,77g penG/g resina, ou seja, um valor maior que capacidade máxima de adsorção da resina XAD-4 ($q^* = 0,59$ g penG/ g resina, a pH 4,0 e 4°C). Considerando-se ainda o tempo de adsorção, nesse mesmo intervalo de pH, tem-se uma produtividade de 0,31g penG/g resina/hora.

Reduzindo-se o pH para 3,5 a capacidade de adsorção da resina e a produtividade também se reduziram para 0,66 g penG/g resina e 0,22 g penG/g resina/hora. A redução do pH para 3,2, levou a um aumento da capacidade total de adsorção para 0,99 g penG/g resina e da produtividade para 0,28 g penG/ g resina/hora.

A diminuição da capacidade total e produtividade que se observou quando se reduziu o pH de 4,0 para 3,5 pode ser explicada pela menor concentração de penG na solução no início de cada etapa. Contudo, o grande aumento na eficiência de adsorção que se observou quando se reduziu o pH de 3,5 para 3,2 pode ser explicado pela maior quantidade da forma neutra nessa faixa de operação e também pela degradação de 25% de penG nas condições do ensaio (concentração de penG no final da etapa de pH 3,5 a pH 3,2 durante 30 minutos).

Em novo experimento, 18 mL de uma solução 50 g.L^{-1} de penG inicialmente em pH 7,0, teve seu pH vagarosamente ajustado até o valor de 4,0. Atingido pH 4,0, adicionou-se 1,5 g de XAD-4. Iniciou-se, então, a adsorção e o monitoramento da concentração de penG até que atingisse o equilíbrio de adsorção. Após 60 minutos, ajustou-se o pH para 3,5 permanecendo por mais 30 minutos. Os resultados obtidos nesse ensaio estão apresentados na Figura 4.15.

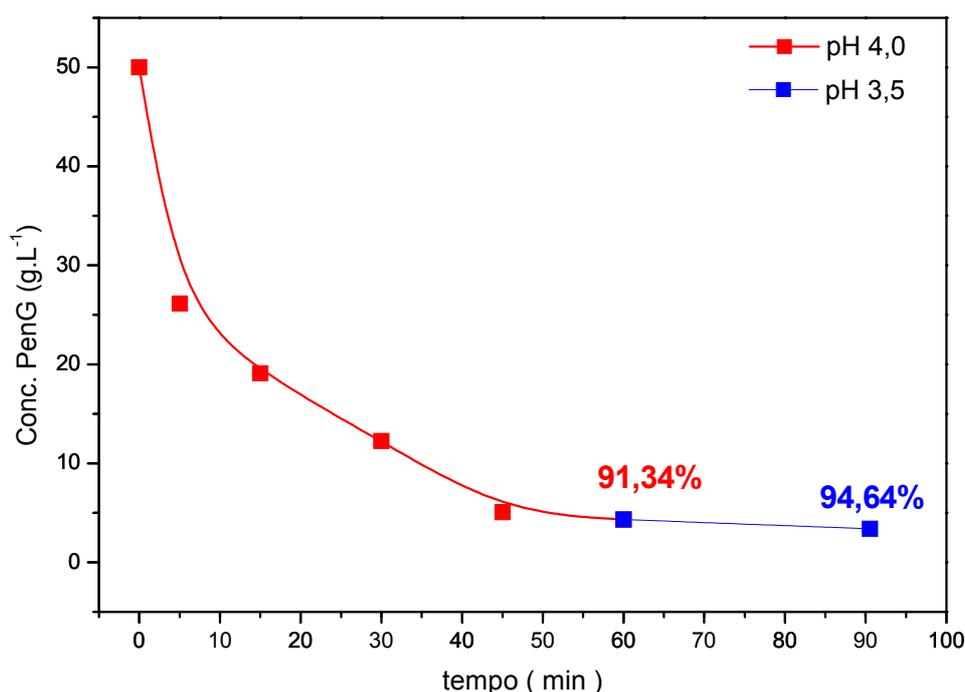


Figura 4.15.: Resultados da adsorção de penG a 4°C na faixa de pH de 3,5 a 4,0 utilizando 1,5g de XAD-4 adicionado em 18mL de caldo com 50g.L^{-1} de penG

Como se pode observar no gráfico de Figura 4.15, após 1h de experimento a pH 4,0, aproximadamente 91% da penG presente havia sido adsorvida na resina XAD-4, ou seja, $0,55\text{g penG/g resina}$ ($0,55\text{g penG/g resina/hora}$). Entretanto, $0,77\text{g penG/g resina}$ foi adsorvida usando-se gradiente, com produtividade de $0,31 \text{ g penG/g resina/hora}$. Houve, assim, aumento da eficiência de adsorção, mas diminuição da produtividade. Nova tentativa de redução do pH para 3,5 elevou a capacidade de adsorção para $0,58\text{g penG/g resina}$, com redução da produtividade para $0,38 \text{ g penG/g resina/hora}$. O uso de gradiente parece realmente melhorar o desempenho da adsorção, além de proteger a penG da degradação química. Contudo, trabalhando-se com alta concentração de penG, em baixo

valor de pH (sem gradiente), a velocidade de adsorção é muito maior, sendo o ideal trabalhar diretamente com baixo pH.

A tentativa de adsorção com o pH ajustado diretamente para 3,5 resultou em degradação visível a olho nu da penG, confirmando a ocorrência de polimerização e degradação do antibiótico em valores de pH inferiores a 4,0, quando concentrações mais elevadas da forma neutra estão presentes.

O estudo efetuado mostrou que se for aumentada a quantidade de resina, pode-se atingir altas eficiências a pH 4,0 em 45 minutos ou a pH mais baixos em menores tempos. A pH 4,0, o antibiótico permanece estável mesmo a altas concentrações. Essa operação é mais simples, pois requer apenas uma etapa de redução do pH do caldo de cultivo antes do contato com a resina. Se a adsorção na indústria for realizada em batelada, conforme estudado aqui, recomenda-se, pois, operação a pH 4,0. Passamos assim, a seguir, para a próxima etapa prevista: estudo da dessorção de penG.

4.8 DESSORÇÃO DE PENICILINA G

Experimentos preliminares mostraram que o contato com fase aquosa a pH 7,0 não era suficiente para dessorver penG, sendo necessário assim uso de co-solvente para aumentar a hidrofobicidade da fase eluente. Optou-se por usar etanol como co-solvente, devido ser um composto biocompatível, além da sua grande aceitação do ponto de vista ambiental e ampla disponibilidade no Brasil. Na etapa de dessorção, foi elaborado um procedimento experimental levando em consideração todas as variáveis independentes que poderiam influenciar no processo, como: temperatura do eluente, valores de pH do eluente e composição da mistura água/etanol.

Esse procedimento experimental foi realizado em duas etapas: um delineamento composto central rotacional (DCCR) para a análise dos efeitos principais das variáveis sobre as respostas e seqüencialmente, outro planejamento fatorial completo reduzindo o número de variáveis e alterando as faixas de estudo em função do impacto que elas tiveram sobre as respostas.

Nos ensaios de dessorção, misturou-se 0,1g de XAD-4, contendo penG adsorvida com 2 mL de mistura água/etanol durante 1 hora. A porcentagem de penG dessorvida no eluente era medida utilizando-se hidrólise enzimática com PGA e quantificando-se o 6-APA liberado pela reação com PDAB. A base de Schiff formada era quantificada espectrofotometricamente, conforme descrito em Material e Métodos.

Assim, foi realizado um planejamento fatorial completo 2^3 , incluindo os seis pontos axiais e quatro repetições no ponto central, totalizando 18 ensaios. A Tabela 4.9 apresenta os valores utilizados no planejamento e a Tabela 4.10, apresenta a porcentagem de penG desorvida em cada ensaio.

Tabela 4.9.: Valores utilizados do 1º DCCR para três fatores

Variáveis	-1,68	-1	0	1	1,68
T (°C)	4,0	5,6	8,0	10,4	12,0
pH	4,0	4,6	5,5	6,4	7,0
[EtOH]%	0,0	20,0	50,0	80,0	100,0

Tabela 4.10.: Valores codificados e resposta da porcentagem de penG desorvida no 1º delineamento

Ensaio	T (°C)	pH	[EtOH]	% Desorvida
1	-1	-1	-1	29,62
2	+1	-1	-1	34,02
3	-1	+1	-1	32,90
4	+1	+1	-1	31,09
5	-1	-1	+1	64,09
6	+1	-1	+1	62,85
7	-1	+1	+1	74,39
8	+1	+1	+1	75,34
9	-1,68	0	0	66,07
10	+1,68	0	0	68,97
11	0	-1,68	0	65,60
12	0	+1,68	0	63,47
13	0	0	-1,68	31,45
14	0	0	+1,68	79,58
15	0	0	0	70,36
16	0	0	0	73,15
17	0	0	0	70,53
18	0	0	0	72,36

Conforme as condições utilizadas, a porcentagem de penG desorvida variou de 29,62 a 79,58%. Os pontos centrais apresentam uma pequena variação, indicando uma boa reprodutibilidade do processo.

Através dos resultados obtidos foi possível determinar os coeficientes de regressão que estão apresentados na Tabela 4.11.

Tabela 4.11.: Coeficientes de regressão para a resposta no 1º delineamento

	Coeficientes de Regressão	Erro Padrão	t(8)	p-valor	Lim. Conf. - 95%	Lim. Conf. +95%
Média	72,15	4,09	17,66	<0,0001	62,73	81,58
T(L)	0,53	2,21	0,24	0,8184	-4,58	5,63
T(Q)	-3,92	2,30	-1,70	0,1270	-9,22	1,39
pH(L)	1,43	2,21	0,65	0,5360	-3,67	6,54
pH(Q)	-4,97	2,30	-2,16	0,0626	-10,28	0,33
[EtOH] (L)	16,84	2,21	7,60	0,0001	11,73	21,95
[EtOH] (Q)	-8,16	2,30	-3,55	0,0075	-13,47	-2,86
T x pH	-0,50	2,89	-0,17	0,8664	-7,18	6,17
T x [EtOH]	-0,36	2,89	-0,12	0,9041	-7,03	6,31
pH x [EtOH]	2,81	2,89	0,97	0,3607	-3,87	9,48

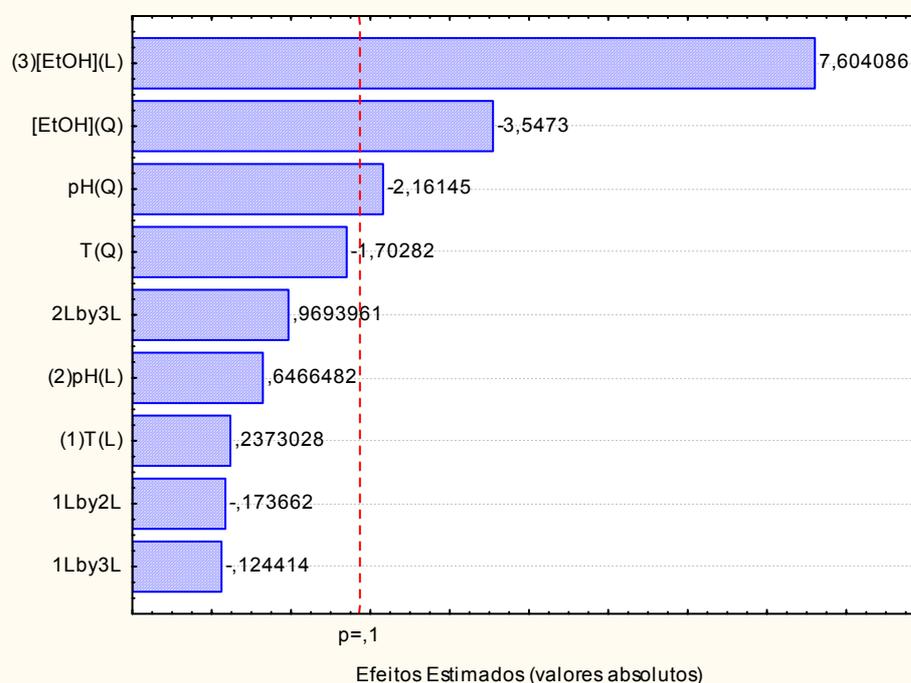


Figura 4.16.:Diagrama de Pareto para o 1º delineamento

Como pode ser observado na Tabela 4.11, somente os parâmetros, linear e quadrático, da variável concentração de etanol e o parâmetro quadrático da variável pH do modelo foram significativos ($p\text{-valor} < 0,1$), como confirmado pelo Diagrama de Pareto (Figura 4.16).

Pode-se, então, elaborar um modelo com as variáveis codificadas:

$$\%DESSORVIDA = 72,15 - 4,97 \text{ pH}^2 + 16,84 [\text{EtOH}] - 8,16 [\text{EtOH}]^2$$

Analisando-se a Tabela 4.12, verificamos que o F calculado foi significativo ($p\text{-valor} < 0,01$) e a porcentagem de variação explicada, de 90,31%.

Tabela 4.12.: ANOVA para a resposta no 1º delineamento

	Soma de Quadrados	Grau de Liberdade	Quadrado Médio	F calculado	p-valor
REGRESSÃO	4991,44	9	554,60	8,28	0,0037
RESÍDUOS	535,85	8	66,98		
TOTAL	5527,29	17			

% variação explicada (R^2) = 90,31 $F_{9;8;0,05} = 3,39$ (tabelado)

Esses resultados indicam uma relativa concordância entre os valores experimentais e previstos pelo modelo, expressos na Figura 4.17. Pela Figura 4.18 podemos observar que os erros de ajustamento estão independentes e normalmente distribuídos em torno da reta.

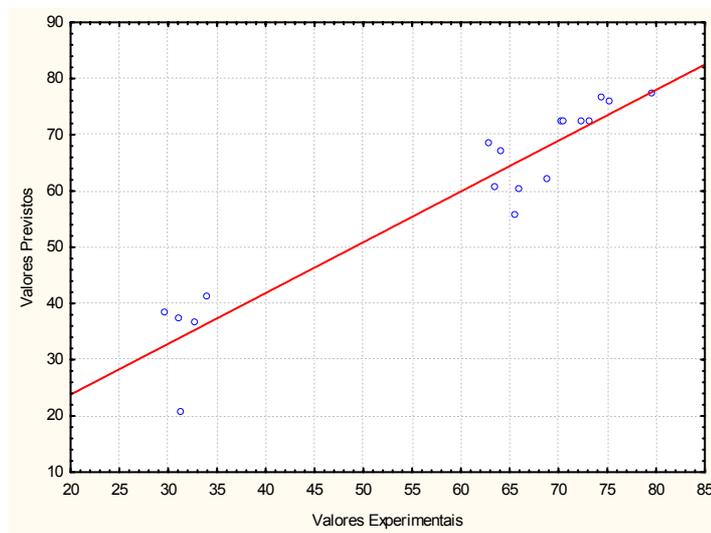


Figura 4.17.: Valores experimentais *versus* valores previstos pelo modelo para a resposta no 1º delineamento

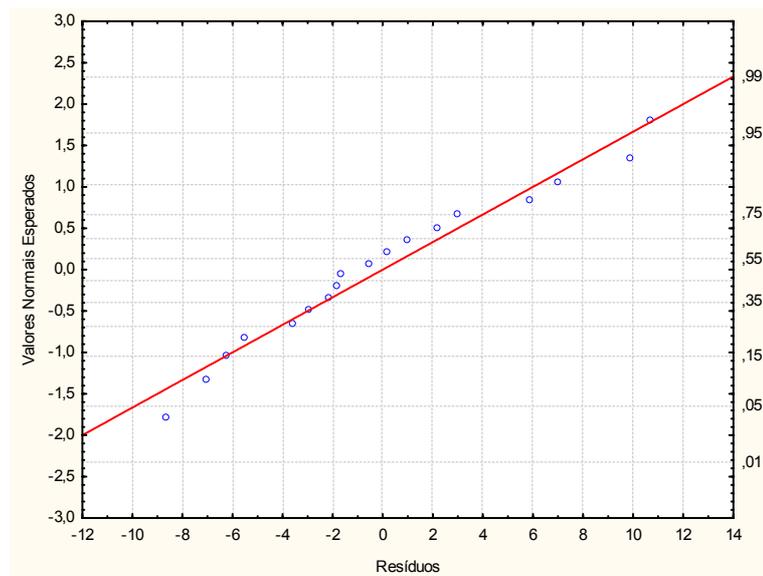


Figura 4.18.: Distribuição dos resíduos em torno da reta que indica normalidade para a resposta no 1º delineamento

O delineamento composto central rotacional (DCCR) utilizado neste processo foi muito interessante para avaliar os fatores que afetam a desorção da penG. Os modelos foram significativos, sendo possível construir as superfícies de resposta (Figura 4.19) e definir as regiões de interesse.

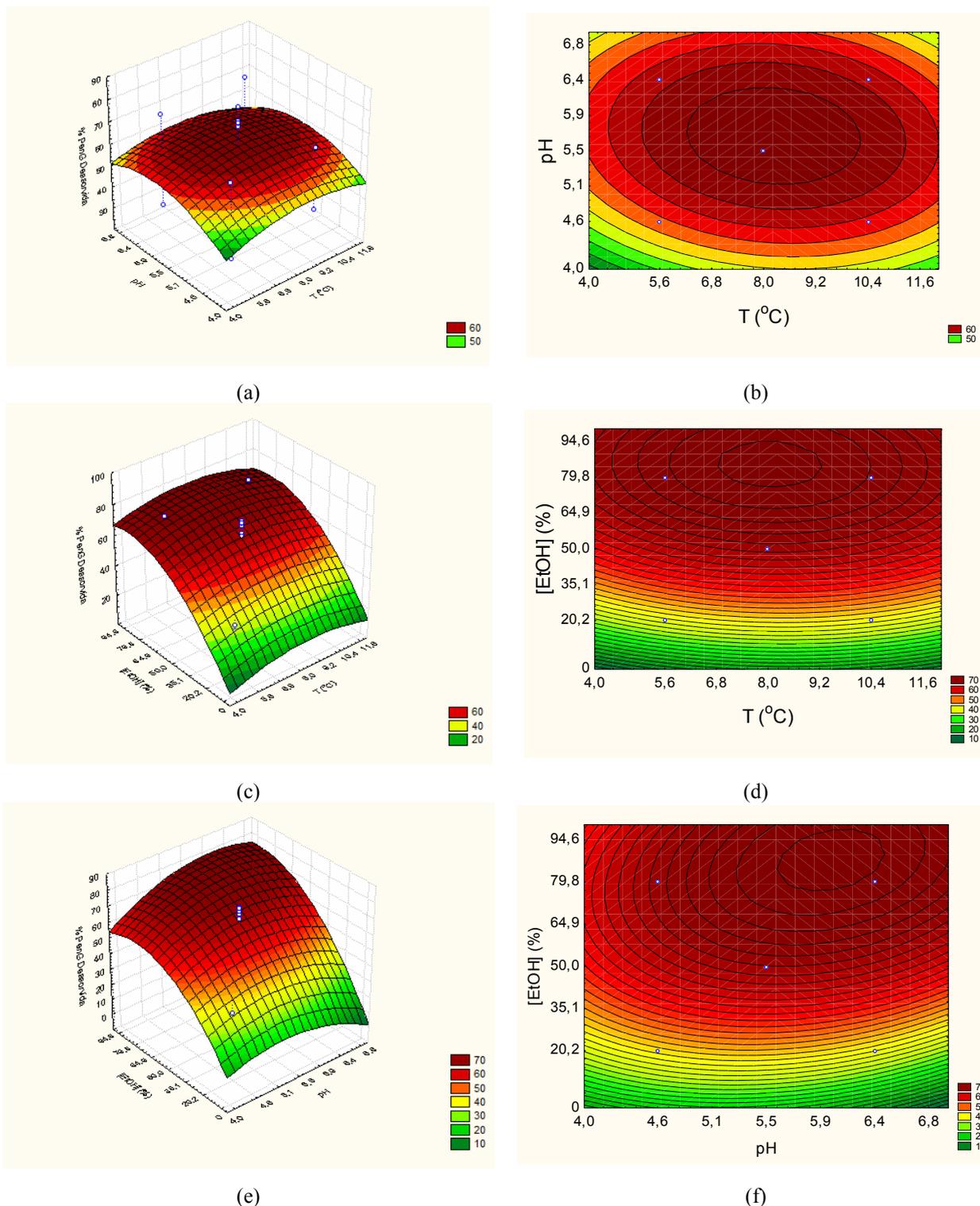


Figura 4.19.: Superfícies de resposta e curva de contorno para a desorção de penG (%) em função da temperatura e pH (a) e (b), da temperatura e [EtOH] (c) e (d) e do pH e [EtOH] (e) e (f) no 1º delineamento

Observando-se as superfícies de resposta, para maximizar a dessorção da penG os ensaios devem ser realizados entre valores de pH 5,2 a 6,8 em uma concentração de etanol entre 65% e 100%. Como observado na Figura 4.19 (c) e (d), a temperatura de dessorção não é significativa, assim fixou-se 8°C (valor no ponto central) como a temperatura de estudo.

Definidas as faixas mais adequadas para maximizar a dessorção da penG, foi realizado outro planejamento fatorial completo 2^2 , incluindo os quatro pontos pseudo-axiais e três repetições no ponto central, totalizando 11 ensaios. Cada ensaio foi realizado em duplicata. A Tabela 4.13 apresenta os valores utilizados no planejamento e a Tabela 4.14, apresenta a porcentagem de penG dessorvida em cada ensaio.

Tabela 4.13.: Valores utilizados do 2º DCCR para dois fatores

Variáveis	-1	0	1
pH	5,2	6,0	6,8
[EtOH]	65,0	82,5	100,0

Tabela 4.14.: Valores codificados e resposta da porcentagem de penG dessorvida no 2º delineamento

Ensaio	pH	[EtOH]	% Dessorvida
1.1	-1	-1	76,64
1.2	+1	-1	80,21
1.3	-1	+1	79,29
1.4	+1	+1	80,19
1.5	0	0	94,93
1.6	0	0	97,74
1.7	0	0	96,25
1.8	0	-1	74,06
1.9	0	+1	66,38
1.10	-1	0	65,70
1.11	+1	0	70,15
2.1	-1	-1	77,05
2.2	+1	-1	78,33
2.3	-1	+1	82,52
2.4	+1	+1	77,01
2.5	0	0	94,48
2.6	0	0	91,93
2.7	0	0	94,56
2.8	0	-1	57,53
2.9	0	+1	79,34
2.10	-1	0	74,28
2.11	+1	0	80,33

Conforme as condições utilizadas, a porcentagem de penG desorvida variou de 57,53 a 97,74%. Os pontos centrais apresentam uma pequena variação, indicando uma boa repetibilidade do processo.

Através dos resultados obtidos foi possível determinar os coeficientes de regressão que estão apresentados na Tabela 4.15.

Tabela 4.15.: Coeficientes de regressão para a resposta no 2º delineamento

	Coeficientes de Regressão	Erro Padrão	t(13)	p-valor	Lim. Conf. - 95%	Lim. Conf. +95%
Média	92,68	0,57	162,97	<0,0001	91,46	93,91
pH(L)	0,32	0,45	0,71	0,4904	-0,66	1,30
pH(Q)	-0,70	0,70	-1,00	0,3363	-2,20	0,81
[EtOH] (L)	0,23	0,45	0,51	0,6165	-0,75	1,21
[EtOH] (Q)	-14,81	0,70	-21,26	<0,0001	-16,31	-13,30
pH x [EtOH]	-1,18	0,55	-2,13	0,0525	-2,38	0,01

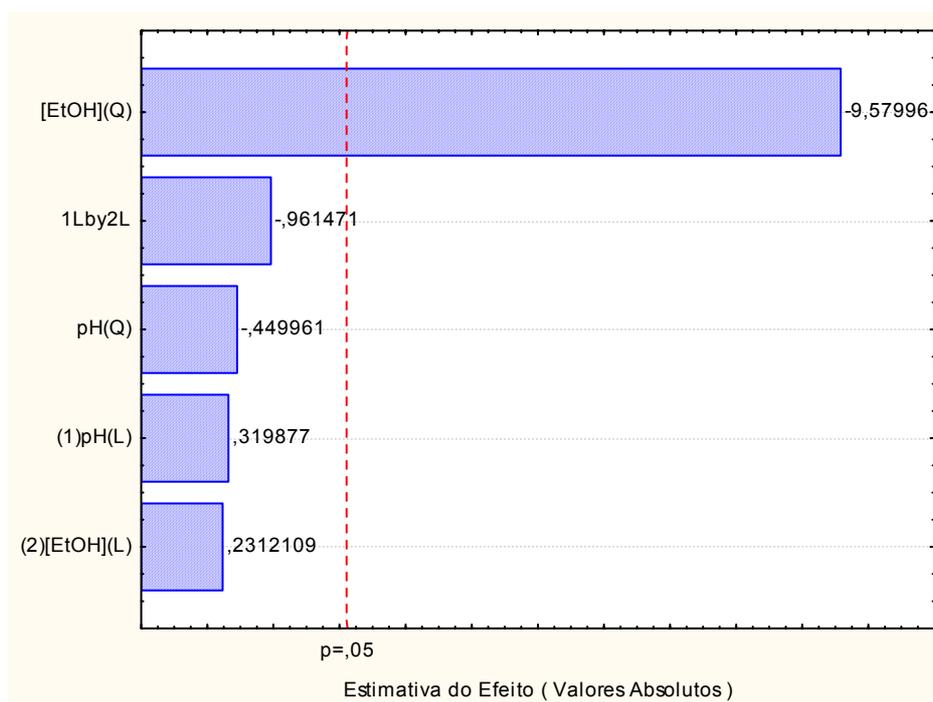


Figura 4.20.: Diagrama de Pareto para o 2º delineamento

Neste caso, a desorção mostrou-se altamente influenciada pela concentração de etanol (Figura 4.20). O parâmetro quadrático da variável concentração de etanol do modelo sobressaiu diante das outras variáveis podendo-se elaborar um modelo com a variável codificada:

$$\%DESSORVIDA = 92,68 - 14,81 [\text{EtOH}]^2$$

Analisando-se a Tabela 4.16, verificamos que o F calculado foi significativo (p -valor $< 0,01$) e a porcentagem de variação explicada, de 86,51%.

Tabela 4.16.: ANOVA para a resposta no 2º delineamento

	Soma de Quadrados	Grau de Liberdade	Quadrado Médio	F calc	p-valor
REGRESSÃO	1241,67	5	248,33	20,51	< 0,0001
RESÍDUOS	193,68	16	12,10		
TOTAL	1435,35	21			

% variação explicada (R^2) = 86,51 $F_{5;16;0,05} = 2,85$ (tabelado)

Esses resultados indicam uma relativa concordância entre os valores experimentais e previstos pelo modelo, expressos na Figura 4.21. Pela Figura 4.22 podemos observar que os erros de ajustamento estão independentes e normalmente distribuídos em torno da reta.

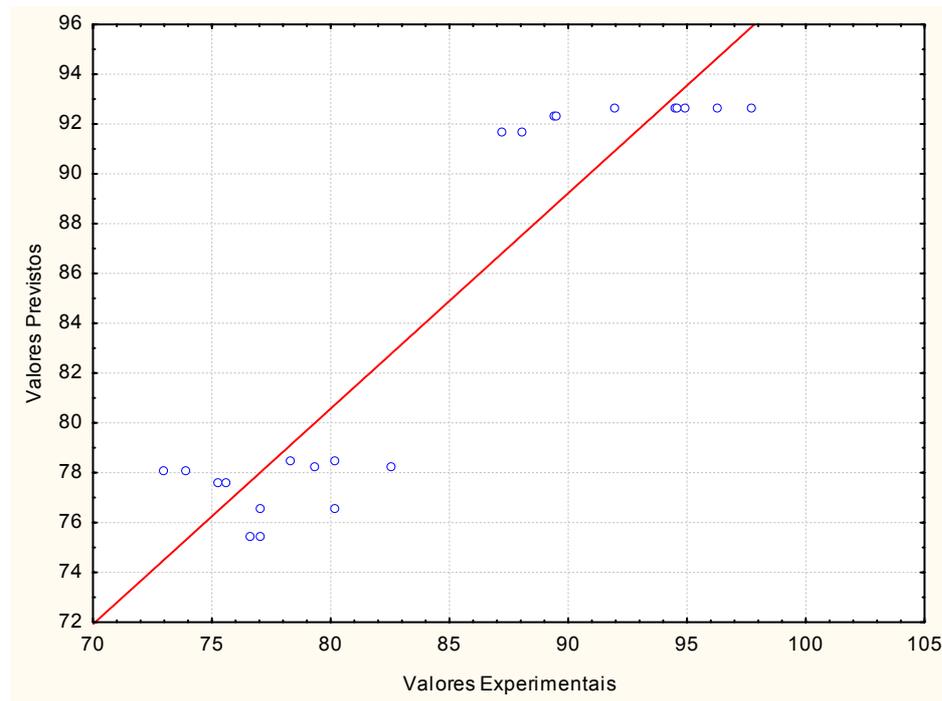


Figura 4.21.: Valores experimentais versus valores previstos pelo modelo para a resposta no 2º delineamento

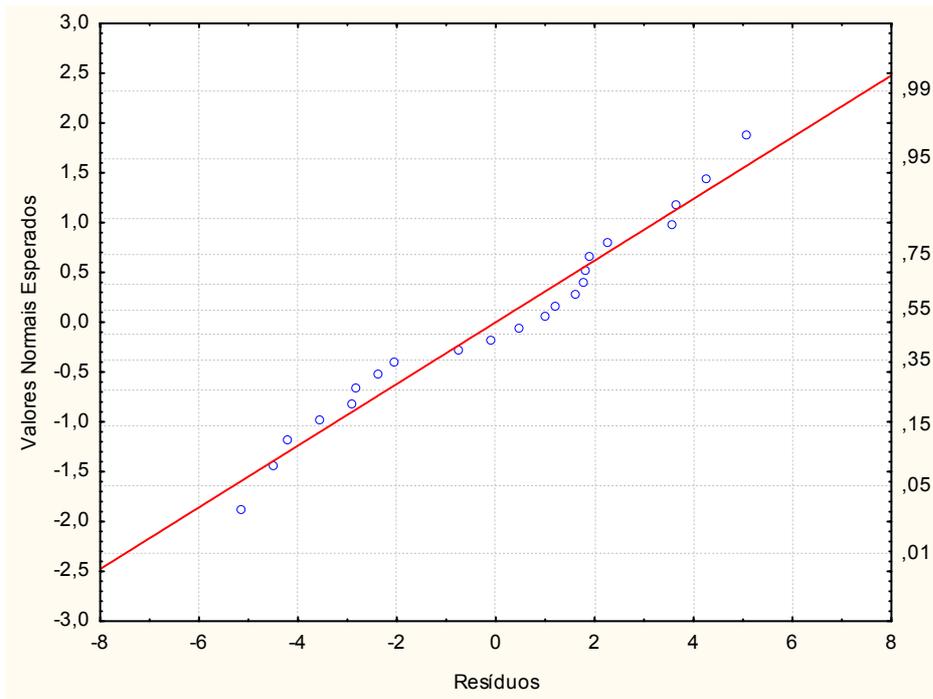


Figura 4.22.: Distribuição dos resíduos em torno da reta que indica normalidade para a resposta no 2º delineamento

Os modelos foram significativos, sendo possível construir a superfície de resposta (Figura 4.23), a curva de contorno (Figura 4.24) e definir as regiões de interesse.

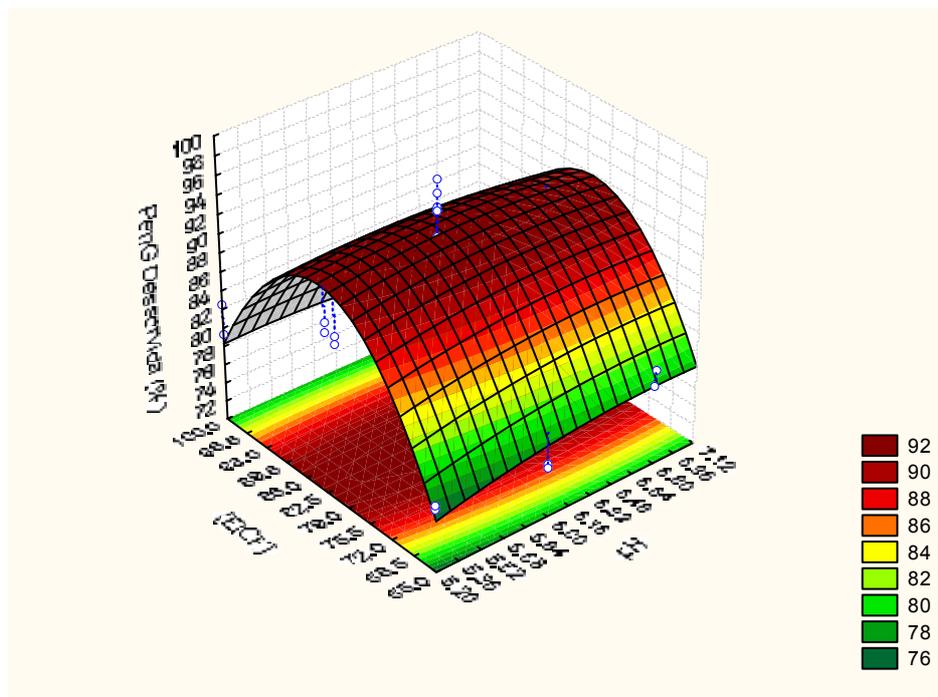


Figura 4.23.: Superfícies de resposta para a dessorção de penG (%) em função da temperatura e [EtOH] no 2º delineamento

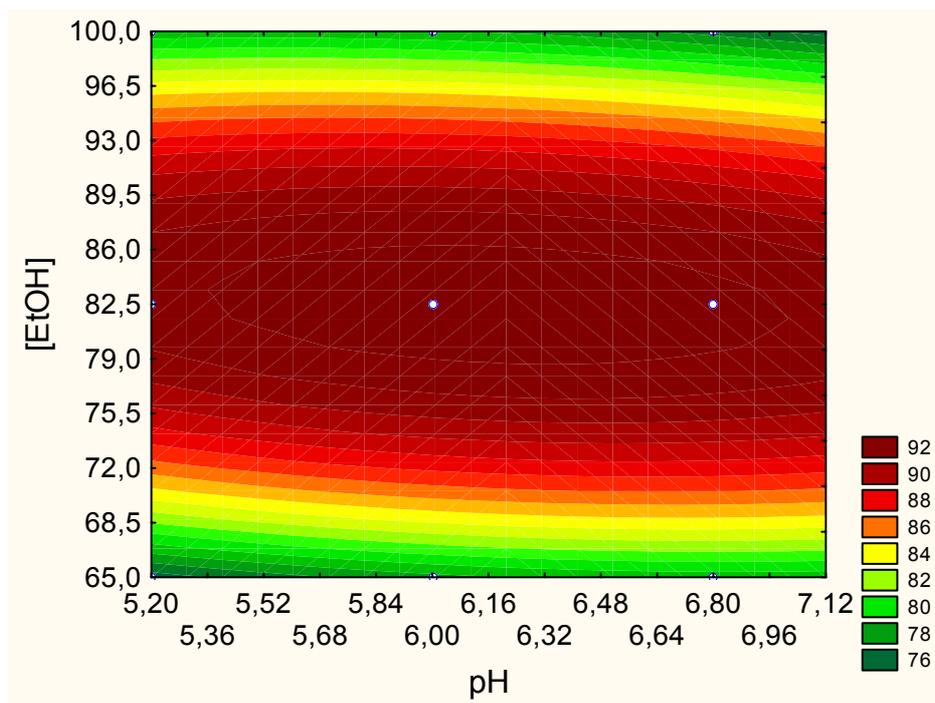


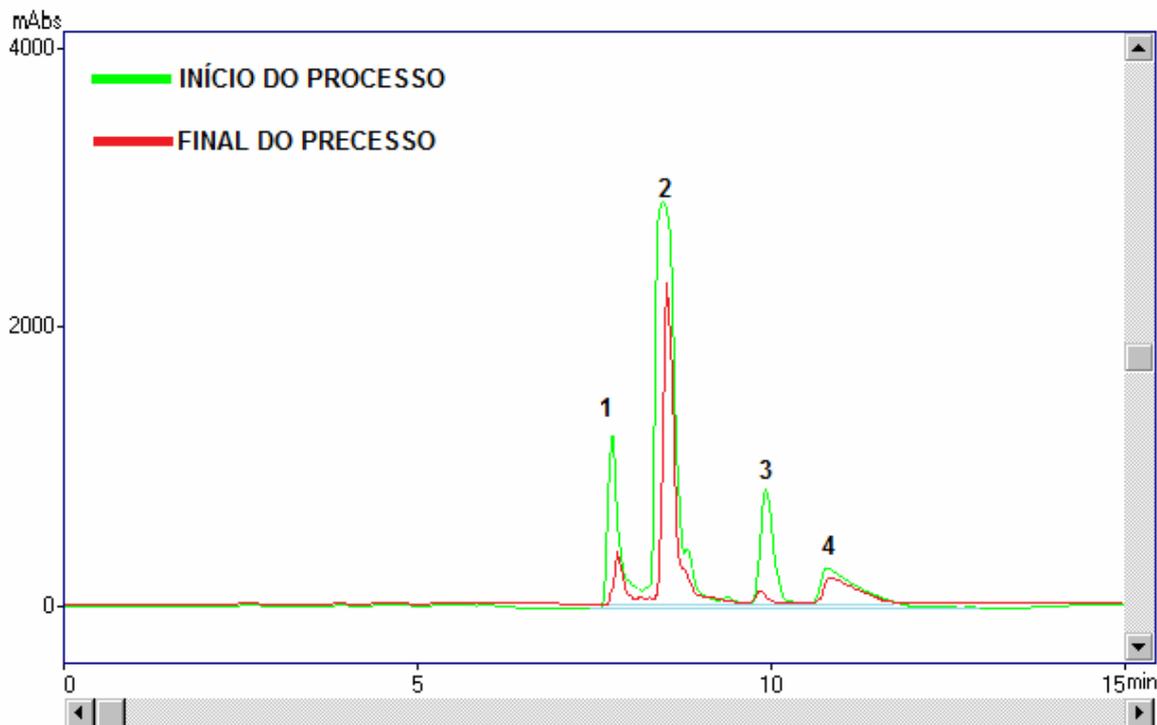
Figura 4.24.: Curva de contorno para a dessorção de penG (%) em função da temperatura e [EtOH] no 2º delineamento

Observando-se curva de contorno, para maximizar a dessorção da penG, em torno de 92%, os ensaios devem ser realizados entre valores de pH 5,4 a 7,0 em uma concentração de etanol entre 80% e 86%. Para uma melhor dessorção, optou-se por utilizar valores de pH e de etanol que, entre essas faixas, são mais centrais.

Assim, a dessorção será conduzida a 8°C em pH 6,2, utilizando-se como eluente uma mistura com 82,5% de etanol e 17,5% de água.

4.9 PUREZA DA PENG AO FINAL DO PROCESSO DE PURIFICAÇÃO

A Figura 4.25 mostra os cromatogramas obtidos do caldo de cultivo contendo penG e da solução eluída da resina XAD-4, onde podem ser vistos os vários picos correspondentes aos vários componentes presentes. Os picos 1, 2 e 3 são referentes a impurezas e o pico 4 é referente a penG. A linha verde mostra os picos antes da adsorção e a linha vermelha apresenta todos os picos referentes aos componentes dessorvidos da resina em solução etanólica.



(C)

Figura 4.25.: Cromatogramas referentes ao processo de purificação de penG. Linha verde: caldo fermentativo contendo penG 50 g.L^{-1} e Linha vermelha componentes do caldo fermentativo dessorvidos com etanol 82,5%.

Observa-se que há uma redução significativa na intensidade dos picos referentes a impurezas do caldo de cultivo. A Tabela 4.17 apresenta os valores da área de cada pico.

Tabela 4.17.: Relação dos picos dos cromatogramas referentes ao processo de purificação e os respectivos valores de suas áreas

Pico	Composto	Área Inicial	Área Final
1	Impureza 1	10664218	2728350
2	Impureza 2	47176290	22694758
3	Impureza 3	9441466	-
4	Penicilina	8762369	4810532

A Figura 4.26 mostra uma foto do caldo de cultivo antes da adsorção e depois da dessorção com solução etanólica.



Figura 4.26.: caldo de cultivo antes da adsorção e depois da dessorção com solução etanólica.

Observa-se que ocorre uma significativa clarificação do caldo de cultivo, indicando que vários componentes do caldo foram separados da penicilina. Esses componentes não são detectados nas condições de análise do CLAE.

Analisando os cromatogramas, os valores da área e a foto comparativa, pode-se observar que a resina Amberlite XAD-4 é seletiva na adsorção e dessorção da penG. Uma grande quantidade de impurezas presentes inicialmente no caldo de cultivo não estavam presentes ao final do processo na solução de etanol/água. Apesar de alguns contaminantes competirem com a penG pelos sítios ativos da resina, a adsorção de penG é maior do que a adsorção dos contaminantes, o que já havia sido indicado pela comparação entre as isotermas obtidas para adsorção de penG quando esta estava dissolvida em água ou no meio de cultivo. CASEY *et al.* (2007), que estudaram a eficácia de XAD-4 para recuperação de geldanamicina de caldos de fermentação, também concluiu que a resina era seletiva para esse antibiótico.

Assim, a penG apresenta-se em uma forma bem mais pura ao final do processo de purificação. A resina apresenta assim não só alta capacidade de adsorção de pen G, mas também boa seletividade para o antibiótico.

4.10 SOLUBILIDADE DE PENICILINA G EM DIFERENTES SOLVENTES

Após o processo de dessorção, havia uma solução de penG em 82,5% de etanol e 17,5% de água. Para a utilização da penG, havia a necessidade dela ser retirada da solução e cristalizada. Então, houve a necessidade de estudar a solubilidade da penG em água, etanol, mistura 82,5% etanol/água e acetato de isobutila.

Os ensaios foram realizados a temperatura constante, 8°C. Em frascos com 100mL de cada solvente em pH 6,2, adicionou-se penG até o ponto em que havia a presença de penG precipitada, indicando saturação da solução. Os frascos foram lacrados e colocados sob

agitação suave por quatro horas. Em seguida, os frascos permaneceram em repouso para as suspensões sedimentarem. Após a sedimentação, amostras do sobrenadante foram retiradas por meio de uma seringa acoplada a um filtro de 0,2 μ m, evitando a passagem de sólidos. Após essa etapa, as amostras foram analisadas por cromatografia de alta eficiência (CLAE) e os resultados estão apresentados na Tabela 4.18.

Tabela 4.18.: Solubilidade da penG em diferente solventes a 8°C e pH 6,2

Solvente	Solubilidade (gPenG / L solvente)
H ₂ O	385,00
82,5% EtOH-H ₂ O	179,79
EtOH	4,59
Acetato de isobutila	0,24

Para a mistura etanol-água, foram realizados os mesmos ensaios variando a temperatura da solução e os resultados estão apresentados na Figura 4.26.

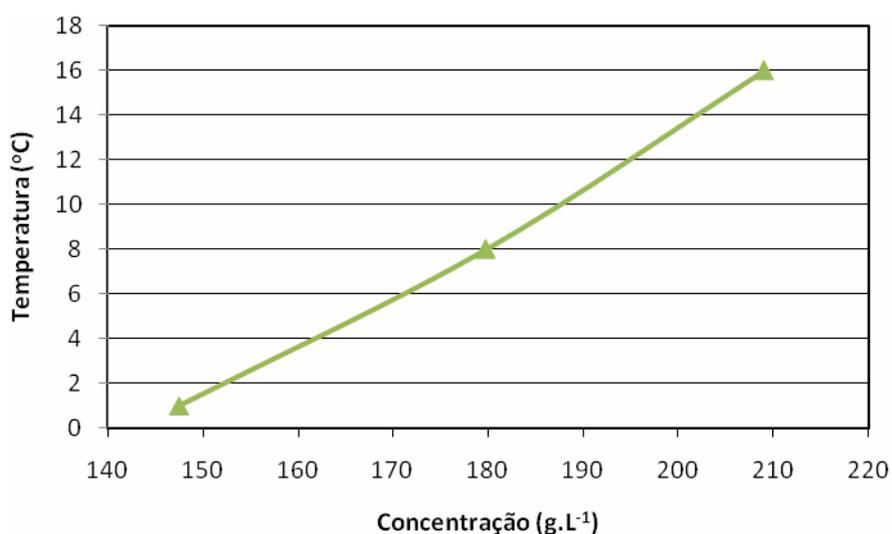


Figura 4.27.: Solubilidade da penG em mistura de etanol-água a pH 6,2 em diferentes temperaturas (0, 8 e 16°C)

Os resultados do estudo de solubilidade mostram que penG é altamente solúvel na mistura etanol-água. A cristalização da penG a partir da mistura etanol-água irá assim requerer sua concentração, através da evaporação do etanol a vácuo, para evitar degradação do antibiótico. Contudo, ela deverá ser obtida já com grande pureza, diferentemente da penG importada, que se apresenta sempre com alto grau de impurezas, requerendo sua dissolução e recristalização para separação das impurezas. O etanol teria mesmo que ser recuperado, tal como já ocorre atualmente com o solvente utilizado na extração líquido-líquido. A cristalização é etapa dominada na indústria e não era objeto de estudo neste trabalho. O estudo de solubilidade foi feito apenas com o intuito de gerar dados fundamentais para a etapa seguinte de cristalização. Um estudo mais aprofundado,

levando-se em conta a evaporação do etanol, deve ser realizado para obtenção de penG sólida.

5 CONCLUSÕES

✓ O método enzimático desenvolvido para a quantificação de penG apresentou boa reprodutibilidade e exatidão. Esses resultados foram possíveis devido à obtenção da curva de calibração utilizando como solvente o caldo de cultivo, e também devido ao uso de excesso de enzima no meio e sua especificidade. Assim, esse método desenvolvido para quantificar penG em caldo de cultivo, associada à quantificação do 6-APA através de reação com PDAB, foi utilizado neste trabalho de maneira satisfatória, visto que penG em diferentes meios e em ampla faixa de concentração foi determinada com exatidão e precisão.

✓ Independente do tempo de cultivo, a composição do meio não apresenta influência na análise de penG.

✓ A adsorção de penG em resinas hidrofóbicas é favorecida em meio ácido. Entretanto, nesta condição ocorre degradação do antibiótico. Os resultados obtidos nesse trabalho indicam que penG é estável a 4 e 12°C em valores de pH 4,0 a 7,0 por 1 hora. Para valores de pH mais ácidos esse tempo diminui, sendo necessário um maior cuidado para evitar a degradação.

✓ A resina Amberlite XAD-4 é o melhor adsorvente para extração de penG presente em caldo de cultivo. O estado de equilíbrio da adsorção de penG na resina Amberlite XAD-4 em valores de pH de 4,0; 5,0 e 7,0 em 4 e 12°C foi atingido com 45 minutos.

✓ A isoterma de Langmuir foi o modelo que melhor representou a adsorção de penG utilizando a resina Amberlite XAD-4, apresentando capacidade máxima de adsorção de 0,595g penG/g resina, a pH 4, 4°C.

✓ O uso de gradiente de pH durante o processo de adsorção de penG é eficiente e evita perdas por degradação, mas comparado ao processo sem gradiente é mais demorado, apresentando o mesmo nível de eficiência.

✓ Para se obter uma máxima dessorção, o processo deve ser realizado a 8°C e utilizar como eluente uma mistura de 82,5 % etanol e 17,5 % água em pH 6,2.

✓ Os resultados obtidos indicam a viabilidade técnica da utilização de adsorção em resina hidrofóbica para recuperação de penG.

✓ Resumo das condições definidas para o processo de purificação de penG por adsorção em resina Amberlite XAD-4 em batelada (Tabela 5.1).

Tabela 5.1.: Resumo das condições definidas para o processo de purificação de penG por adsorção em resina Amberlite XAD-4 em batelada

	ADSORÇÃO	DESSORÇÃO
TEMPERATURA DE OPERAÇÃO(°C)	4	8
pH	4,0	6,2
VARIAÇÃO DE pH	SEM GRADIENTE	SEM GRADIENTE
AGITAÇÃO	Agitador mecânico SEM PÁ (1250 rpm)	Agitação em Shaker (250 rpm)
TEMPO DE OPERAÇÃO (min)	45	60
EFICIÊNCIA DA OPERAÇÃO	~91% de penG adsorvida	~92% de penG dessorvida
COMPISIÇÃO DO ELUENTE	-	82,5 % ETANOL E 17,5% ÁGUA DEIONIZADA

6 SUGESTÕES

Um estudo mais detalhado do grau de pureza e a cristalização da penG após a dessorção deve ser realizado para otimizar o processo. Outras resinas poderiam ser testadas a fim de comparar a eficiência de adsorção e seletividade com os resultados obtidos nesse trabalho.

O processo de utilização de adsorção em resina hidrofóbica para recuperação de penG requer ainda estudo em coluna, para otimização e posterior estudo de viabilidade econômica. É possível que esse estudo resulte em custo maior do processo de adsorção em relação à extração com solvente. Contudo, as pressões ambientais são a cada dia mais fortes e o processo proposto substitui solventes altamente hidrofóbicos, cujo escape para o ambiente é altamente prejudicial, por etanol, um solvente de baixa hidrofobicidade, amplamente disponível e aceito ambientalmente.

Assim, mesmo com a hipótese de que essa substituição não seja economicamente viável no momento, ela poderá se tornar imperativa nos próximos anos, o que justifica a continuidade deste estudo para otimização do processo.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALICINO, J.F. **Iodometric assay of natural and synthetic penicillins, 6-aminopenicillanic acid and cephalosporin C**, *Analytical Chemistry*, v.33, p.648-649, 1961
- AKSU, Z., GONEN, F. **Biosorption of phenol by immobilized activated sludge in a continuous packed bed: prediction of breakthrough curves**, *Process Biochem.*, p. 1-16, 2003.
- ARNOTT, I.A., WEATHERLEY, L. R.; **The stability of penicillin G during recovery by electrical enhanced extraction**, *Process Biochemistry*, v.30, nº 5, p.447-455, 1995.
- BALASINGHAM, K., WARBURTON, D., DUNNILL, P., AND LILLY, M.D; *Biochimica et Biophysica Acta*, v.276, p. 250-256, 1972.
- BARBOZA, M. **Estudo cinético de adsorção, modelagem dinâmica e otimização de processo contínuo de purificação de cefalosporina C**, Tese Doutorado, Faculdade de Engenharia de Alimentos - Universidade Estadual de Campinas, Brasil, 1998.
- 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
- BAUTISTA, L.F., MARTINEZ, M., ARACIL, J., **Adsorption equilibrium of alpha-amylase in aqueous solutions**. *Aiche Journal*, 1999
- 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.; CUSLLER, E.L.; WEI-SHOU, H., **Bioseparations: downstream processing for biotechnology**, Wiley-interscience, 1988.
- BENEDICT, R.G., SCHMIDT, W.H., COGHILL, R.D., OLESON, A.P., **Penicillin III, The stability of penicillin in aqueous solution**. *J. Bacterial*, V. 49, p 85-95, 1945
- BOOTHROYD, B. **Recovery of antibiotics using column extraction methods**. *Bioactive Microbial Products 3 – Downstream Processing*. J.D. Stowell; R.J. Bailey; D.J. Winstanley Ed. Academic Press, p 59-75, 1986.
- BORBA, C.E., **Modelagem da remoção de metais pesados em coluna de adsorção de leito fixo**, Dissertação de Mestrado, Faculdade de Engenharia Química- Universidade Estadual de Campinas, Brasil, 2006.
- BOX, G. E. P.; HUNTER, W. G.; HUNTER, J. S. **Statistics for Experimenters**. New York, John Wiley & Sons Inc, 1978.
- BOX, G. E. P.; DRAPER, N. R. **Empirical Model-Building and Response Surfaces**. New York, John Wiley & Sons Inc, 1987.
- CASEY, J. T.; WALSH P. K.; O'SHEA D. G. **Characterisation of adsorbent resins for the recovery of geldanamycin from fermentation broth**. *Separation and purification technology* , vol. 53, nº3, pp. 281-288, 2007.

- COLLINS, C.H.; BRAGA, B.L.; BONATO, P.S.; **Introdução a Métodos Cromatográficos**. Editora Unicamp, Campinas, 1995.
- CRUEGER, W.; CRUEGER, A.; **Biotechnology: A Textbook of Industrial Microbiology**. Sunderland, Sinauer Associates Inc., cap. 13, 1984.
- DO, DUONG D., **Adsorption Analysis: Equilibrium and Kinetics**. London: Imperial College Press, 1998
- DOULIA, D.; RIGAS, F.; GIMOUHOPOULOS, C., **Removal of amino acids from water by adsorption on polystyrene resins**, *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, v.76, p.83-89, 2001.
- DROUGUETT, S. E. **Elementos de Catalisis Heterogênea**. Washington, D.C. Editora Eva V. Chesneau, 1983.
- DUTTA, M. DUTTA, N.N. BHATTACHARYA K.G. **Aqueous phase adsorption certain semi-synthetic antibiotics onto polymeric resins and activated carbon**. *Separation and Purification Technology*, v. 16, p.213-224, 1999.
- ERNEST Jr., M. V., WHITLEY, R. D., MA, Z., LINDA WANG, N. H. **Effects of mass action equilibria in fixed bed multicomponent ion exchange dynamics**, *Industrial Engineering Chemical Research*, v. 36, p. 212-226, 1997.
- GHOSH, A.C.; BORA, M.M.; DUTTA.N.N. **Development in liquid membrane separation of beta-lactam antibiotics**. *Bioseparation*, v. 6, p 91-105, 1996
- GRIME, J.K., TAN, B. **Direct titration of antibiotics with iodate solution**. *Analytica Chimica Acta*,v.105, p 361-368, 1979
- GRZEGORCZYK, D. S.; CARTA, G., **Adsorption of amino acids on porous polymeric adsorbents – I. Equilibrium**, *Chemical Engineering Science*, v. 51, n. 5, p.807-817, 1996.
- GUDE, M. T.; LUUK, A. M.; VAN DER WIELEN; LUYBEN, K. Ch. A. M. **Phase Behavior of α -aminoacids in multicomponent aqueous alkanol solutions**. *Fluid Phase Equilibria*. Amsterdam, v.116, n. 1-2, p. 110-117, 1996
- HERSCHBACH G.J.M., VAN DER BEEK C.P., VAN DIJK P.W.M. **The penicillins: properties, biosynthesis, and fermentation**. In: *Vandamme EJ, editor. Biotechnology of Industrial Antibiotics*. New York: Marcel Dekker, p. 45–104, 1984.
- HILLENGA, D. J.; VERSANTVOORT, H. J. M; VAN DER MOLEN, S.; DRIESSEN, A. J. M.; KONINGS, W. N.. **Penicillium chrysogenum takes up the penicillin G precursor phenylacetic acid by passive diffusion**. *Appl. Environ. Microbiol.* v. 61; p 2589–2595, 1995.
- HINES, A. L., MADDOX, R. N., **Mass Transfer: Fundamentals and Applications**, Prentice-Hall PTR, New Jersey, p 542 , 1985
- HOMEM, E. M. **Remoção de chumbo, níquel e zinco em zeólita utilizando sistema de leito fluidizado**, Dissertação de Mestrado, Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, p 112, 2001.

- KENNEDY, J.F. CABRAL, J.M.S. **Recovery Processes for Biological Materials**. *John Wiley and Soons*, New York, 1995.
- KHEIROLOMOOM, A., KAZEMI-VAYSARI, A., ARDJMAND, M., BARADAR-KHOSHFETRAT, A., **The combined effect of pH and temperature on penicillin G decomposition and its stability modeling**. *Process Biochem.* V. 35, p. 205–211, 1999.
- KO, D. C. K., PORTER, J. F., McKAY, G. **Film-pore diffusion model for the fixed bed sorption of copper and cadmium ions onto bone char**, *Wat. Res.*, v.35, p. 3876-3886, 2001.
- LIGON, B.L. **Penicillin: Its Discovery and Early Development**. *Seminars in Pediatric Infectious Diseases*, v. 15, n 1, p. 52-57, 2004
- MENEZES, J.C. **Análise e Modelação da Produção de Penicilina-G à Escala Piloto-Industrial**, Tese Doutorado, Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa, 1996.
- MENEZES, J.C.; ALVES, T.P.; CARDOSO, J.P.; **Biotechnologia Microbiana: A Produção de Penicilina**, *Biotechnologia: Fundamentos e Aplicações*, cap. 12, pp 15, N. Lima e M. Mota (eds.), DIFEL, 2000.
- MICHNIK, A.; MICHALIC, K.; MARCOIN W., **Influence of magnesium glutamate on stability of penicillin G aqueous solution**, *International Journal of Pharmaceutics*, v.273, p.149-158, 2004.
- NAVARRO, P.G.; MARTINEZ, J.H.; GARCIA, A.A.M.; DE LAS PARRAS, P.J.M., **β -lactam degradation catalyzed by Cd^{2+} ion in methanol**, *International Journal of Biological Macromolecules*, v.25, p.337-343, 1999.
- NAVARRO, P.G.; BLÁSQUEZ, I.H.; OSSO, B.Q.; GARCIA, A.A.M.; DE LAS PARRAS, P.J.M., PUENTEDURA, M.I.M., **Penicillin degradation catalyzed by Zn^{2+} ion in methanol**, *International Journal of Biological Macromolecules*, v.33, p.159-166, 2003.
- NATHWANI, D. WOOD, M.J. **Penicillins: A current review of their clinical pharmacology and therapeutic use**. *Drugs*, v.45, p.866-894, 1993.
- ORNELAS, N.J.R., **Separação e purificação de amoxicilina produzida por síntese enzimática**, Dissertação de Mestrado, Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Ceará, 2003.
- PELKZAR, J.R.; CHAN, E.; KRIEG, N.R. **Microbiology**, *Mc Graw-Hill*, 5 ed. New York, 1986
- PIKAL, M.J., LUKES, A.L., LANG, J.E., GAINES, K., **Quantitative crystallinity determinations for β -lactam antibiotics by solution calorimetry: correlations with stability**. *J. Pharm. Sci.*, v. 67, p. 767– 772, 1978.
- PRASAD, R.; GUPTA, A.K.; BAJPAI, R.K. **Adsorption of Streptomycin on ion exchange resins: equilibrium and kinetic studies**. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, v.30, p. 324-331, 1980.

- REED, B. E., MATSUMOTO, M. R., **Modeling cadmium adsorption by active carbon using the Langmuir and Freundlich isotherm expressions**, Separation Science and Technology, v. 28, n. 13&14, p. 2179-2195, 1993.
- REHM, H. J.; REED, G., **Biotechnology**, 3 – Bioprocessing- VCH Publishers Inc., New York, 1993.
- RODRIGUES, M. L.; KALIL, S. J.; MAUGERI, F. **Planejamento Fatorial e "Screening Design" como ferramenta para Otimização de Processos Bioquímicos**. In : XII SINAFERM - Simpósio Nacional de Fermentações. Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia - MG, 1998.
- ROHM & HAAS Co. – **Ion Exchange Resin**, Technical Notes – Philadelphia, U. S. A., 1965
- ROHM & HAAS Co. – **Boletim Técnico da resina Amberlite XAD -7**, 2003
- ROHM & HAAS Co. – **Boletim Técnico da resina Amberlite XAD -761**, 2004
- ROHM & HAAS Co. – **Boletim Técnico da resina Amberlite XAD -4**, 2003
- RUTHVEN, D. M., **Principles of adsorption and adsorption processes**, John Wiley & Sons – Canada, U. S. A., 1984.
- SHULEN, L.M., KARGI, F. **Bioprocess Engineering – Basic Concepts**. Prentice Hall, 1992.
- SILVA, E. A., COSSICH, E. S., TAVARES, C. R. G., CARDOZO, L., GUIRARDELLO, R. **Modeling of copper (II) biosorption by marine alga Sargassum sp. in fixed bed**, Process Biochem., v. 38, p. 791-799, 2002.
- SLEIJKO, L. F. **Adsorption Technology: A Step-by-Step Approach to Process Evaluation and Application**. Marcel Dekker, 1985.
- SMITH, A. **Cephalosporins**. Comprehensive Biotechnology, editado por Murray Moo-Young, Pergamon Press, Oxford, v. 3, 1985.
- STAEHELI, J. **Variable Screening and Optimization**. Developments in Biological Standardization, v. 66, p. 143-153, 1987.
- STROMINGER JL. **Antibiotics**; 1:706, 1967
- TREYBAL, R.E., **Mass Transfers Operation**, McGraw-Hill, New York, 1980.
- VERRAL, M., **Downstream Processing of Natural Products**, John Wiley & Sons - England, 1996.
- VIEIRA, M. F., BARBOZA, M., GIORDANO, R. L. C. **Adsorption of components of enzymatic synthesis of ampicillin on different hydrophobic resins**. Applied Biochemistry and Biotechnology, v.108, p.705 - 714, 2003.
- VOSER, W., **Isolation of hydrophilic fermentation products by adsorption chromatography**, J. Chem. Tech. Biotechnol, v.32, p.109-118, 1982
- ZAMBON, G. A. **Remoção de chumbo (Pb⁺²) utilizando zeólita natural clinoptilolita**, Dissertação de Mestrado, Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, pp 97, 2003.

ZHU, Y.; HOOGMARTENS, J.; VAN SCHEPDAEL, A.; DALLE, J., **Analysis of benzylpenicillin by capillary eletrophoresis**, Journal of Chromatography, v.792, p.83-88, 1997.