

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

**ESTUDO DA PURIFICAÇÃO DO ÁCIDO
CLAVULÂNICO UTILIZANDO PROCESSO
CONTÍNUO DE ADSORÇÃO**

Renata Maria Rosas Garcia Almeida

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de São Carlos como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Engenharia Química, área de concentração em Pesquisa e Desenvolvimento de Processos Químicos.

Orientador:

Prof. Dr. Carlos Osamu Hokka

São Carlos - SP

– 2003 –

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

A447ep

Almeida, Renata Maria Rosas Garcia.

Estudo da purificação do ácido clavulânico utilizando
processo contínuo de adsorção / Renata Maria Rosas
Garcia . -- São Carlos : UFSCar, 2003.
170 p.

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

1. Engenharia bioquímica. 2. Purificação de antibióticos.
3. Ácido clavulânico. 4. Adsorção. I. Título.

CDD: 660.63 (20^a)

“Cuidado com o que você
deseja, pois você pode
conseguir.”

(Dito Popular)

*A Patrick e Rafael, meus
amores.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, por tudo que consegui até hoje.

Ao meu orientador Prof. Dr. Carlos Osamu Hokka pela confiança, orientação e compreensão no decorrer deste trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, pelo financiamento da pesquisa.

Ao meu marido Patrick pelo amor, paciência e compreensão em todos os nossos momentos. Ao meu “pequeno grande amor” Rafael por me ensinar a amar incondicionalmente.

Aos meus queridos pais, Aglivan e Gervane; as minhas irmãs Rubia, Rosa e Roberta. Aos meus sogros, Jesus e Irainê; a minha cunhada Patricia; aos meus sobrinhos Raissa, Bruna, Gabriel, Caio e Maria Clara, e à toda minha família.

Ao Prof. Dr. Marlei Barboza pela amizade e ajuda indispensável nos ensaios e simulações.

Ao Doutorando Alvaro Batista Neto pela amizade, pelas dicas importantes e disponibilidade em ajudar.

Ao Doutorando Amauri Alves Ferreira pela amizade e ajuda na etapa de otimização.

A todos os professores e funcionários do DEQ-UFSCar, que contribuíram para a realização deste trabalho e à Profa. Dra. Maria Lúcia G. C. Araujo (UNESP-Araraquara).

Aos amigos do laboratório Adriano, Amadeus, Catarina, Daniela, Ester, João Rosa, Luis Claudio, Juliana, Marina, Amanda, Neander por toda ajuda, amizade e ensinamentos no decorrer deste trabalho.

A todos os amigos do DEQ-UFSCar, em especial a Charles e Célia Maria.

A Alex e Silvana, Luciano e Marilene pelos momentos agradáveis de lazer e meditação.

A minha amiga Marcinha.

Aos amigos da Catedral de São Carlos, Pastoral Familiar e ECC.

Por fim, a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	i
LISTA DE TABELAS	vii
NOMENCLATURA	x
RESUMO	xiii
ABSTRACT	xiv
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
2.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS	5
2.2 ÁCIDO CLAVULÂNICO	7
2.3 RECUPERAÇÃO DE PRODUTOS BIOTECNOLÓGICOS	9
2.4 PROCESSO DE ADSORÇÃO	10
2.4.1 TIPOS DE ADSORÇÃO	10
2.4.2 ADSORVENTES	12
2.4.3 EQUILÍBRIO DE ADSORÇÃO	13
2.4.4 SISTEMAS DE ADSORÇÃO	17
2.5 RECUPERAÇÃO DE PRODUTOS BIOTECNOLÓGICOS POR ADSORÇÃO	20
2.5.1 RECUPERAÇÃO DE PRODUTOS BIOTECNOLÓGICOS POR ADSORÇÃO EM BATELADA	21
2.5.2 RECUPERAÇÃO DE PRODUTOS BIOTECNOLÓGICOS POR ADSORÇÃO CONTÍNUA	29
2.6 PURIFICAÇÃO DE ÁCIDO CLAVULÂNICO	30
2.7 HIDRÓLISE DE COMPOSTOS BETA-LACTÂMICOS	36
3 MATERIAIS E MÉTODOS	41
3.1 MATERIAIS	41
3.1.1 MICRORGANISMO	41
3.1.2 RESINAS	41
3.2 EQUIPAMENTOS	42

3.2.1 BIORREATORES	42
3.2.2 REATORES DE MISTURA	42
3.2.3 MESA INCUBADORA ROTATIVA	42
3.2.4 HPLC	42
3.2.5 ESPECTROFOTÔMETRO	42
3.2.6 BANHO TERMOSTATIZADO	43
3.2.7 CENTRÍFUGA REFRIGERADA	43
3.2.8 MEDIDOR DE pH	43
3.2.9 ULTRAFREEZER	43
3.2.10 COMPUTADOR	43
3.2.11 OUTROS EQUIPAMENTOS	44
3.3 MÉTODOS	44
3.3.1 OBTENÇÃO DE SOLUÇÕES DE ÁCIDO CLAVULÂNICO	44
3.3.2 TRATAMENTO DO MEIO FERMENTADO	44
3.3.3 ANÁLISE DA CONCENTRAÇÃO DE ÁCIDO CLAVULÂNICO	45
(A) HPLC	45
(B) Espectrofotometria	47
3.3.4 ANÁLISE DA CONCENTRAÇÃO DE CONTAMINANTES	47
4 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	48
4.1 ESTUDO DA HIDRÓLISE DO ÁCIDO CLAVULÂNICO EM SOLUÇÃO AQUOSA E EM MEIO FERMENTADO	48
4.2 CINÉTICA DE ADSORÇÃO E DESSORÇÃO	49
4.3 ISOTERMAS DE EQUILÍBRIO	49
4.4 PROCESSO CONTÍNUO	50
4.5 OTIMIZAÇÃO DE PARÂMETROS DO PROCESSO CONTÍNUO	51
4.5.1 OBTENÇÃO DOS INTERVALOS PARA AS VARIÁVEIS INDEPENDENTES	52
5 MODELAGEM MATEMÁTICA	53
5.1 MODELO CINÉTICO	53
5.1.1 CINÉTICA DE ADSORÇÃO	53
5.1.2 DESSORÇÃO DE AC NA RESINA	54
5.2 MODELO MATEMÁTICO PARA ADSORÇÃO EM TANQUE AGITADO	54
5.3 MODELAGEM MATEMÁTICA DO PROCESSO CONTÍNUO	57
5.3.1 PRIMEIRO ESTÁGIO	58

(A)Balanço para AC:	58
(B) Balanço para o eluente:	59
(C) Balanço para os contaminantes inertes:	60
5.3.2 SEGUNDO ESTÁGIO:	60
(A) Balanço para AC:	60
(B)Balanço eluente:	61
(C)Balanço para os contaminantes inertes:	61
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO	63
6.1 ENSAIO EM TANQUE AGITADO EM BATELADA	63
6.1.1 RESINA IRA 400	63
(A) Ciclo hidroxila	64
(B) Ciclo cloreto	65
6.1.2 RESINA XAD-4	67
6.2 CINÉTICAS DE ADSORÇÃO E DESSORÇÃO DE AMOSTRAS DE AC PURO	69
6.2.1 INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO INICIAL	69
6.2.2 INFLUÊNCIA DA FONTE DE ÁCIDO CLAVULÂNICO	70
6.2.3 INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA	71
(A) Etapa de adsorção	71
(B) Etapa de dessorção	72
6.2.4 INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DE ELUENTE	74
(A) Etapa de adsorção	74
(B) Etapa de dessorção	75
6.3 ISOTERMAS DE ADSORÇÃO	77
6.4 CINÉTICA DE HIDRÓLISE	78
6.4.1 DEGRADAÇÃO DE ÁCIDO CLAVULÂNICO EM SOLUÇÃO AQUOSA	79
6.4.2 DEGRADAÇÃO DE AMOSTRAS DE ÁCIDO CLAVULÂNICO DE FERMENTAÇÃO	81
6.4.3 DEPENDÊNCIA DA CONSTANTE DE HIDRÓLISE COM A TEMPERATURA	83
6.5 CINÉTICAS DE ADSORÇÃO E DESSORÇÃO DE AMOSTRAS DE AC DE FERMENTAÇÃO	85

6.5.1 INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO INICIAL	85
6.5.2 INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA	87
6.5.3 INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DE ELUENTE	88
6.5.4 INFLUÊNCIA DO pH	91
6.6 ISOTERMAS DE ADSORÇÃO DE AMOSTRAS DE AC DE FERMENTAÇÃO	92
6.6.1 INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA	92
6.6.2 INFLUÊNCIA DO pH	94
6.6.3 INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DE ELUENTE	96
6.7 MODELAGEM E SIMULAÇÃO DO PROCESSO EM BATELADA	97
6.7.1 AMOSTRAS DE AC PURO – DIFERENTES TEMPERATURAS	97
6.7.2 AMOSTRAS DE AC PURO – DIFERENTES CONCENTRAÇÕES INICIAIS	101
6.7.3 AMOSTRAS DE AC DE FERMENTAÇÃO	105
6.8 PROCESSO CONTÍNUO	108
6.8.1 SIMULAÇÃO DO PROCESSO CONTÍNUO	108
6.8.2 ENSAIOS DO PROCESSO CONTÍNUO	111
6.9 OTIMIZAÇÃO DE PARÂMETROS DO PROCESSO CONTÍNUO	113
6.9.1 ESTUDO DO PROCESSO POR ANÁLISE DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA	113
6.9.2 INFLUÊNCIA DAS VARIÁVEIS DO PROCESSO CONTÍNUO NO RENDIMENTO	116
6.9.3 INFLUÊNCIA DAS VARIÁVEIS DO PROCESSO CONTÍNUO NO FATOR DE CONCENTRAÇÃO	124
6.9.4 INFLUÊNCIA DAS VARIÁVEIS DO PROCESSO CONTÍNUO NO FATOR DE PURIFICAÇÃO	135
6.9.5 VALIDAÇÃO DO PROCESSO DE OTIMIZAÇÃO DO RENDIMENTO	145
6.10 COMPARAÇÃO ENTRE PROCESSO CONTÍNUO E PROCESSO LEITO FIXO	148
7 CONCLUSÕES	150
7.1 ESTUDO DE DEGRADAÇÃO	150
7.2 ESTUDO DE ADSORÇÃO E DESSORÇÃO EM BATELADA	150
7.3 MODELAGEM E SIMULAÇÃO	151
7.4 PROCESSO CONTÍNUO	152

7.5 OTIMIZAÇÃO DE PARÂMETROS	153
7.6 PROCESSO CONTÍNUO X LEITO FIXO	153
8 SUGESTÕES	154
9 BIBLIOGRAFIA	155
10 LISTA DE PUBLICAÇÕES	163
10.1 PUBLICAÇÕES EM EVENTOS CIENTÍFICOS	163
10.2 ARTIGOS DE PERIÓDICOS	163
10.3 ARTIGOS EM MEIO ELETRÔNICO	164
APÊNDICE A	165
APÊNDICE B	167

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1: Reação de hidrólise da penicilina pela enzima beta-lactamase (Coleman et al., 1994).	7
Figura 2.2: Estrutura química do ácido clavulânico (AC) (Reading e Cole, 1977).	8
Figura 2.3: Esquema do mecanismo de troca iônica (Collins et al., 1995).	12
Figura 2.4: Esquema do princípio da adsorção por bioafinidade (Collins et al., 1995).	12
Figura 2.5: (a) Esquema de um trocador catiônico; (b) Esquema de um trocador aniônico (Collins et al., 1995).	13
Figura 2.6: Tipos de isotermas de adsorção (Giles et al., 1960).	14
Figura 2.7: Esquema de uma coluna de leito fixo (Belter, 1985)	17
Figura 2.8: (a) Curva de ruptura para adsorção em coluna de leito fixo. C_b é a concentração de ruptura C_e a concentração no equilíbrio. (b) Perfil de concentração ao longo da coluna no tempo de ruptura (t_b) (Belter, 1985).	18
Figura 2.9: Esquema do processo contínuo.	19
Figura 2.10: Processo SORBEX (Gubulin, 1990).	20
Figura 2.11: Fluxograma para vários estágios de extração em coluna da cefalosporina C (Boothroyd, 1986)	22
Figura 2.12: Diagrama esquemático do processo de recuperação in situ (Hecht et al., 1987). B: bombas.	23
Figura 2.13: Processo de purificação de CPC combinando técnicas de membrana e cromatografia. MF: microfiltração; UF: ultrafiltração; OR: osmose reversa; MWCO: limite de exclusão molecular. (Ghosh et al., 1996).	24
Figura 2.14: Fluxograma do processo de purificação de CPC (Ghosh et al., 1996).	24
Figura 2.15: Esquema do processo de adsorção de cefalosporina C em leito fixo Barboza et al. (2000).	26
Figura 2.16: Esquema da recuperação e purificação do ácido clavulânico com dois métodos alternativos para extração primária (Butterworth, 1984).	32
Figura 2.17: Pontos passíveis de hidrólise na molécula de cefalosporina.	37

Figura 2.18: Ponto passível de hidrólise na molécula de AC.	37
Figura 2.19: Variação da constante de degradação de AC com o pH (Bersanetti et al., 2000).	39
Figura 3.1: Esquema de reação de AC com imidazol (Eckers et al., 1996).	45
Figura 3.2: Cromatograma de AC obtido pelo método de Foulstone e Reading (1982) com reação com imidazol.	46
Figura 3.3: Cromatograma de AC obtido pelo método de Foulstone e Reading (1982) sem reação com imidazol.	46
Figura 3.4: Esquema de quantificação de AC pelo método de reação com imidazol.	47
Figura 4.1: Esquema do processo contínuo de adsorção do ácido clavulânico (Barboza, 1998).	51
Figura 6.1: Ensaio em batelada EB-15 com a resina IRA 400 no ciclo hidroxila em pH=7,0 e $C_0=90,84$ mg/L. Etapa de adsorção.	64
Figura 6.2: Ensaio em batelada EB-17 com a resina IRA 400 no ciclo cloreto em pH=7,0 e $C_0=92,84$ mg/L. Etapa de adsorção.	65
Figura 6.3: Ensaio em batelada EB-17 com a resina IRA 400 no ciclo cloreto em pH=7,0 e $C_0=92,84$ mg/L. Etapa de dessorção.	66
Figura 6.4: Ensaio em batelada EB-16 com a resina XAD-4 em pH=7,0 e $C_0=120,88$ mg/L. Etapa de adsorção.	67
Figura 6.5: Ensaio em batelada EB-16 com a resina XAD-4 em pH=7,0 e $C_0=120,88$ mg/L. Etapa de dessorção.	68
Figura 6.6: Ensaio de adsorção em batelada de ácido clavulânico na resina IRA 400-Cl. Comparação de diferentes concentrações iniciais de AC.	69
Figura 6.7: Ensaio de adsorção em batelada de ácido clavulânico na resina IRA 400-Cl. Comparação de diferentes fontes AC.	70
Figura 6.8: Ensaio de adsorção em batelada de ácido clavulânico na resina IRA 400-Cl. Comparação de diferentes temperaturas na etapa de adsorção.	72
Figura 6.9: Ensaio de adsorção em batelada de ácido clavulânico na resina IRA 400-Cl. Comparação de diferentes temperaturas na etapa de dessorção.	73
Figura 6.10: Ensaio de adsorção em batelada de ácido clavulânico na resina IRA 400-Cl. Comparação de diferentes concentrações de solução de NaCl na etapa de adsorção.	75

- Figura 6.11: Ensaio de adsorção em batelada de ácido clavulânico na resina IRA 400-Cl. Comparação de diferentes concentrações de solução de NaCl na etapa de dessorção. 76
- Figura 6.12: Regressão não-linear dos dados experimentais das isotermas de adsorção de AC na resina IRA 400-Cl. (a) $T=5^{\circ}\text{C}$ ($r^2=0,975$); (b) $T=10^{\circ}\text{C}$ ($r^2=0,993$); (c) $T=23^{\circ}\text{C}$ ($r^2=0,989$); (d) $T=30^{\circ}\text{C}$ ($r^2=0,969$) (Barboza et al., 2003). 78
- Figura 6.13: Hidrólise de ácido clavulânico, pH 6,2, em diferentes temperaturas. (a) AC.1; (b) AC.2. 79
- Figura 6.14: Hidrólise de ácido clavulânico, pH 7,0, em diferentes temperaturas. (a) AC.1; (b) AC.2. 79
- Figura 6.15: Hidrólise de ácido clavulânico (AC.3), em diferentes temperaturas, pH 6.2. (a) 10 e 20°C ; (b) 30 e 40°C . 81
- Figura 6.16: Hidrólise do ácido clavulânico (AC.3) em diferentes temperaturas, pH 7.0. (a) 10 and 20°C ; (b) 30 and 40°C . 82
- Figura 6.17: Temperaturas nas quais os valores de k são iguais em ambos pHs. (a) AC.1, $T_E = 0^{\circ}\text{C}$; (b) AC.2, $T_E = -8^{\circ}\text{C}$; (c) AC.3, $T_E = 5^{\circ}\text{C}$. 85
- Figura 6.18: Ensaio de adsorção em batelada de ácido clavulânico na resina IRA 400-Cl. Comparação de diferentes concentrações iniciais de AC.3. 86
- Figura 6.19: Ensaio de adsorção em batelada em tanque agitado de ácido clavulânico (AC.3) na resina IRA 400-Cl. Comparação de diferentes temperaturas na etapa de adsorção. 88
- Figura 6.20: Ensaio de adsorção em batelada em tanque agitado de ácido clavulânico (AC.3) na resina IRA 400-Cl. Comparação de diferentes concentrações de solução de NaCl na etapa de adsorção a 10°C . 89
- Figura 6.21: Ensaio de adsorção em batelada em tanque agitado de ácido clavulânico (AC.3) na resina IRA 400-Cl. Comparação de diferentes concentrações de solução de NaCl na etapa de adsorção a 20°C . 90
- Figura 6.22: Ensaio de adsorção em batelada em tanque agitado de ácido clavulânico (AC.3) na resina IRA 400-Cl. Comparação de diferentes concentrações de solução de NaCl na etapa de adsorção a 30°C . 90
- Figura 6.23: Ensaio de adsorção em batelada de ácido clavulânico (AC.3) na resina IRA 400-Cl. Comparação de diferentes pHs na etapa de adsorção. 92

- Figura 6.24: Regressão não-linear dos dados experimentais das isotermas de adsorção de AC.3 na resina IRA 400-Cl. (a) $T=10^{\circ}\text{C}$ ($r^2=0,976$); (b) $T=20^{\circ}\text{C}$ ($r^2=0,987$); $T=30^{\circ}\text{C}$ ($r^2=0,989$). 93
- Figura 6.25: Regressão não-linear dos dados experimentais das isotermas de adsorção de AC.3 na resina IRA 400-Cl na temperatura de 10°C . (a) $\text{pH}=6,2$ ($r^2=0,976$); (b) $\text{pH}=4,0$ ($r^2=0,996$). 94
- Figura 6.26: Regressão não-linear dos dados experimentais das isotermas de adsorção de AC.3 na resina IRA 400-Cl na temperatura de 20°C . (a) $\text{pH}=6,2$ ($r^2=0,987$); (b) $\text{pH}=4,0$ ($r^2=0,933$). 94
- Figura 6.27: Regressão não-linear dos dados experimentais das isotermas de adsorção de AC.3 na resina IRA 400-Cl na temperatura de 30°C . (a) $\text{pH}=6,2$ ($r^2=0,989$); (b) $\text{pH}=4,0$ ($r^2=0,991$). 95
- Figura 6.28: Curva cinética de adsorção de AC.1 na resina IRA 400-Cl. Dados experimentais e ajuste pelo modelo proposto. (a) 5°C ; (b) 10°C ; (c) 23°C ; (d) 30°C . (Barboza et al., 2003). 98
- Figura 6.29: Dados experimentais e simulados da dessorção de AC.1 na resina Amberlite IRA 400-Cl com solução de NaCl 10% (p/v). $C_0=\bullet 92,8$ mg/L; $C_0=\blacksquare 961,3$ mg/L; $C_0=\blacktriangle 118,0$ mg/L; $C_0=*\ 103,0$ mg/L; $C_0=\star 98,0$ mg/L. (Barboza et al., 2003). 99
- Figura 6.30: Comportamento de k_3 com a temperatura. Equação de Arrhenius ajustada aos dados experimentais. Fator de frequência: $A=1492,31$ min^{-1} ; Energia de ativação: $E_a=24,26$ KJ.mol^{-1} ; ($r^2=0,997$). (Barboza et al., 2003). 101
- Figura 6.31: Dados experimentais e simulados da cinética de adsorção de AC.1 na resina IRA 400-Cl. Linha contínua ajustada pela Equação 14, linha pontilhada ajustada pela Equação 8 (modelo puramente intrínseco), linha tracejada ajustada pelas Equações 8 e 13. (a) Ensaio 1; (b) Ensaio 2; (c) Ensaio 3; (d) Ensaio 4; (e) Ensaio 5. (Barboza et al., 2002b). 103
- Figura 6.32: Curvas cinéticas para adsorção do ácido clavulânico. Os pontos experimentais são representados por símbolos. Linhas contínuas representam os valores simulados para pH 6,2 e a linha pontilhada para pH 4,0. \bullet EB-29; \blacksquare EB-31; \star EB-32; \blacklozenge EB-33; \blacktriangle EB-34. (Barboza et al. 2002c). 106
- Figura 6.33: Curvas cinéticas para dessorção do ácido clavulânico. Os pontos experimentais são representados por símbolos. Linhas contínuas representam os

- valores simulados para pH 6,2 e a linha pontilhada para pH 4,0. • EB-29; ■ EB-31; ★ EB-32; ◆ EB-33; ▲ EB-34. (Barboza et al. 2002c) 107
- Figura 6.34: Simulações do processo contínuo de purificação de AC. (a) Simulação 1; (b) Simulação 2; (c) Simulação 3; (d) Simulação 4. (Almeida et al., 2001). 110
- Figura 6.35: Resultados simulados e experimentais do processo contínuo de adsorção de AC da simulação 2. (a) primeiro reator; (b) segundo reator. (Almeida et al., 2003a). 112
- Figura 6.36: Resultados simulados e experimentais do processo contínuo de adsorção de AC da simulação 4. (a) primeiro reator; (b) segundo reator. (Almeida et al., 2003a). 112
- Figura 6.37: Curva representativa dos efeitos das principais variáveis do processo contínuo no estudo do parâmetro Y. 117
- Figura 6.38: (a) Curva de Y em função θ_{r1} e θ_{r2} ($\theta_{s1} = -1$; $\varepsilon_{r1} = -1$; $\varepsilon_{r2} = +1$; $C_0 = -1$); (b) Curva de Y em função θ_{r1} e θ_{s1} ($\theta_{r2} = -1$; $\varepsilon_{r1} = -1$; $\varepsilon_{r2} = +1$; $C_0 = -1$). 119
- Figura 6.39: (a) Curva de Y em função θ_{r1} e ε_{r2} ($\theta_{r2} = -1$; $\theta_{s1} = -1$; $\varepsilon_{r1} = -1$; $C_0 = -1$); (b) Curva de Y em função θ_{r1} e C_0 ($\theta_{r2} = -1$; $\theta_{s1} = -1$; $\varepsilon_{r1} = -1$; $\varepsilon_{r2} = +1$). 120
- Figura 6.40: (a) Curva de Y em função θ_{r2} e θ_{s1} ($\theta_{r1} = +1$; $\varepsilon_{r1} = -1$; $\varepsilon_{r2} = +1$; $C_0 = -1$); (b) Curva de Y em função θ_{r2} e ε_{r2} ($\theta_{r1} = +1$; $\theta_{s1} = -1$; $\varepsilon_{r1} = -1$; $C_0 = -1$). 121
- Figura 6.41: (a) Curva de Y em função θ_{r2} e C_0 ($\theta_{r1} = +1$; $\theta_{s1} = -1$; $\varepsilon_{r1} = -1$; $\varepsilon_{r2} = +1$); (b) Curva de Y em função θ_{s1} e ε_{r2} ($\theta_{r1} = +1$; $\theta_{r2} = -1$; $\varepsilon_{r1} = -1$; $C_0 = -1$). 122
- Figura 6.42: (a) Curva de Y em função θ_{s1} e C_0 ($\theta_{r1} = +1$; $\theta_{r2} = -1$; $\varepsilon_{r1} = -1$; $\varepsilon_{r2} = +1$); (b) Curva de Y em função ε_{r2} e C_0 ($\theta_{r1} = +1$; $\theta_{r2} = -1$; $\theta_{s1} = -1$; $\varepsilon_{r1} = -1$). 123
- Figura 6.43: Curva representativa dos efeitos das principais variáveis do processo contínuo no estudo do parâmetro fator de concentração. 125
- Figura 6.44: (a) Curva de FC em função θ_{r1} e θ_{r2} ($\theta_{s1} = +1$; $\varepsilon_{r1} = -1$; $\varepsilon_{r2} = +1$; $C_0 = -1$); (b) Curva de FC em função θ_{r1} e θ_{s1} ($\theta_{r2} = +1$; $\varepsilon_{r1} = -1$; $\varepsilon_{r2} = +1$; $C_0 = -1$). 127
- Figura 6.45: (a) Curva de FC em função θ_{r1} e ε_{r1} ($\theta_{r2} = +1$; $\theta_{s1} = +1$; $\varepsilon_{r2} = +1$; $C_0 = -1$); (b) Curva de FC em função θ_{r1} e ε_{r2} ($\theta_{r2} = +1$; $\theta_{s1} = +1$; $\varepsilon_{r1} = -1$; $C_0 = -1$). 128
- Figura 6.46: (a) Curva de FC em função θ_{r1} e C_0 ($\theta_{r2} = +1$; $\theta_{s1} = +1$; $\varepsilon_{r1} = -1$; $\varepsilon_{r2} = +1$); (b) Curva de FC em função θ_{r2} e θ_{s1} ($\theta_{r1} = -1$; $\varepsilon_{r1} = -1$; $\varepsilon_{r2} = +1$; $C_0 = -1$). 129
- Figura 6.47: (a) Curva de FC em função θ_{r2} e ε_{r1} ($\theta_{r1} = -1$; $\theta_{s1} = +1$; $\varepsilon_{r2} = +1$; $C_0 = -1$); (b) Curva de FC em função θ_{r2} e ε_{r2} ($\theta_{r1} = -1$; $\theta_{s1} = +1$; $\varepsilon_{r1} = -1$; $C_0 = -1$). 130

- Figura 6.48: (a) Curva de FC em função θ_{r2} e C_0 ($\theta_{r1} = -1$; $\theta_{s1} = +1$; $\varepsilon_{r1} = -1$; $\varepsilon_{r2} = +1$);
 (b) Curva de FC em função θ_{s1} e ε_{r1} ($\theta_{r1} = -1$; $\theta_{r2} = +1$; $\varepsilon_{r2} = +1$; $C_0 = -1$). 131
- Figura 6.49: (a) Curva de FC em função θ_{s1} e ε_{r2} ($\theta_{r1} = -1$; $\theta_{r2} = +1$; $\varepsilon_{r1} = -1$; $C_0 = -1$);
 (b) Curva de FC em função θ_{s1} e C_0 ($\theta_{r1} = -1$; $\theta_{r2} = +1$; $\varepsilon_{r1} = -1$; $\varepsilon_{r2} = +1$). 132
- Figura 6.50: (a) Curva de FC em função ε_{r1} e ε_{r2} ($\theta_{r1} = -1$; $\theta_{r2} = +1$; $\theta_{s1} = +1$; $C_0 = -1$);
 (b) Curva de FC em função ε_{r1} e C_0 ($\theta_{r1} = -1$; $\theta_{r2} = +1$; $\theta_{s1} = +1$; $\varepsilon_{r2} = +1$). 133
- Figura 6.51: (a) Curva de FC em função ε_{r2} e C_0 ($\theta_{r1} = -1$; $\theta_{r2} = +1$; $\theta_{s1} = +1$; $\varepsilon_{r1} = -1$).
 134
- Figura 6.52: Curva representativa dos efeitos das principais variáveis do processo contínuo no estudo do parâmetro fator de purificação. 135
- Figura 6.53: (a) Curva de FP em função θ_{r1} e θ_{r2} ($\theta_{s1} = -1$; $\varepsilon_{r1} = -1$; $\varepsilon_{r2} = +1$; $C_0 = -1$);
 (b) Curva de FP em função θ_{r1} e θ_{s1} ($\theta_{r2} = +1$; $\varepsilon_{r1} = -1$; $\varepsilon_{r2} = +1$; $C_0 = -1$). 137
- Figura 6.54: (a) Curva de FP em função θ_{r1} e ε_{r1} ($\theta_{r2} = +1$; $\theta_{s1} = -1$; $\varepsilon_{r2} = +1$; $C_0 = -1$);
 (b) Curva de FP em função θ_{r1} e ε_{r2} ($\theta_{r2} = +1$; $\theta_{s1} = -1$; $\varepsilon_{r1} = -1$; $C_0 = -1$). 138
- Figura 6.55: (a) Curva de FP em função θ_{r1} e C_0 ($\theta_{r2} = +1$; $\theta_{s1} = -1$; $\varepsilon_{r1} = -1$; $\varepsilon_{r2} = +1$);
 (b) Curva de FP em função θ_{r2} e θ_{s1} ($\theta_{r1} = +1$; $\varepsilon_{r1} = -1$; $\varepsilon_{r2} = +1$; $C_0 = -1$). 139
- Figura 6.56: (a) Curva de FP em função θ_{r2} e ε_{r1} ($\theta_{r1} = +1$; $\theta_{s1} = -1$; $\varepsilon_{r2} = +1$; $C_0 = -1$);
 (b) Curva de FP em função θ_{r2} e ε_{r2} ($\theta_{r1} = +1$; $\theta_{s1} = -1$; $\varepsilon_{r1} = -1$; $C_0 = -1$). 140
- Figura 6.57: (a) Curva de FP em função θ_{r2} e C_0 ($\theta_{r1} = +1$; $\theta_{s1} = -1$; $\varepsilon_{r1} = -1$; $\varepsilon_{r2} = +1$);
 (b) Curva de FP em função θ_{s1} e ε_{r1} ($\theta_{r1} = +1$; $\theta_{r2} = +1$; $\varepsilon_{r2} = +1$; $C_0 = -1$). 141
- Figura 6.58: (a) Curva de FP em função θ_{s1} e ε_{r2} ($\theta_{r1} = +1$; $\theta_{r2} = +1$; $\varepsilon_{r1} = -1$; $C_0 = -1$);
 (b) Curva de FP em função θ_{s1} e C_0 ($\theta_{r1} = +1$; $\theta_{r2} = +1$; $\varepsilon_{r1} = -1$; $\varepsilon_{r2} = +1$). 142
- Figura 6.59: (a) Curva de FP em função ε_{r1} e ε_{r2} ($\theta_{r1} = +1$; $\theta_{r2} = +1$; $\theta_{s1} = -1$; $C_0 = -1$);
 (b) Curva de FP em função ε_{r1} e C_0 ($\theta_{r1} = +1$; $\theta_{r2} = +1$; $\theta_{s1} = -1$; $\varepsilon_{r2} = +1$). 143
- Figura 6.60: (a) Curva de Y em função ε_{r2} e C_0 ($\theta_{r1} = +1$; $\theta_{r2} = +1$; $\theta_{s1} = -1$; $\varepsilon_{r1} = -1$).
 144
- Figura 6.61: Resultados simulados e experimentais do processo contínuo de adsorção de AC. Etapa de adsorção. 146
- Figura 6.62: Resultados simulados e experimentais do processo contínuo de adsorção de AC. Etapa de dessorção. 147

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1: Estrutura básica dos grupos de antibióticos beta-lacâmicos e seus principais microrganismos produtores.	6
Tabela 2.2: Classificação das beta-lactamases (Ambler et al., 1980 apud Baggaley et al., 1997).	7
Tabela 2.3: Valores das constantes parciais de hidrólise de AC e da cefalosporina em solução aquosa.	38
Tabela 4.1: Temperaturas e pHs utilizados no estudo da hidrólise de AC.	48
Tabela 4.2: Valores de intervalos assumidos para cada variável independente do processo contínuo de adsorção de AC.	52
Tabela 6.1: Condições de temperatura e concentração inicial para o estudo da influência da temperatura na etapa de adsorção.	71
Tabela 6.2: Condições de temperatura e concentração inicial para o estudo da influência da temperatura na etapa de dessorção.	73
Tabela 6.3: Condições de concentração de solução de NaCl e concentração inicial para o estudo da influência da concentração de solução de NaCl na etapa de adsorção.	74
Tabela 6.4: Condições de concentração de solução de NaCl e concentração inicial para o estudo da influência da concentração de solução de NaCl na etapa de dessorção.	76
Tabela 6.5: Parâmetros da isoterma de equilíbrio segundo modelo de Langmuir para diferentes temperaturas (Barboza et al., 2003).	77
Tabela 6.6: Constante cinética de hidrólise pH 6,2 (a) AC.1 e (b) AC.2.	80
Tabela 6.7: Constante cinética de hidrólise pH 7,0 (a) AC.1 e (b) AC.2.	80
Tabela 6.8: Constante de degradação e tempo de meia-vida do AC.3 a pH 6,2	82
Tabela 6.9: Constante de degradação e tempo de meia-vida do AC.3 a pH 7,0.	82
Tabela 6.10: Equações de Arrhenius.	84
Tabela 6.11: Condições de pH, temperatura e concentração inicial para o estudo da influência da concentração inicial de AC na etapa de adsorção.	86

Tabela 6.12: Condições de pH, temperatura e concentração inicial para o estudo da influência da temperatura de AC.3 na etapa de adsorção.	87
Tabela 6.13: Condições de pH, temperatura, concentração inicial e concentração salina para o estudo da influência da concentração de solução de NaCl etapa de adsorção de AC.3.	89
Tabela 6.14: Condições de pH, temperatura e concentração inicial para o estudo da influência do pH na etapa de adsorção de AC.3.	91
Tabela 6.15: Parâmetros da isoterma de equilíbrio segundo modelo de Langmuir para diferentes temperaturas.	93
Tabela 6.16: Parâmetros da isoterma de equilíbrio segundo modelo de Langmuir para diferentes pHs.	95
Tabela 6.17: Parâmetros da isoterma de equilíbrio segundo modelo de Langmuir para diferentes temperaturas.	96
Tabela 6.18: Parâmetros cinéticos e de transporte para adsorção de AC.1 em tanque agitado. (Barboza et al., 2003).	98
Tabela 6.19: Parâmetros cinéticos e de transporte da etapa de dessorção do AC.1 em tanque agitado (Barboza et al., 2003)..	100
Tabela 6.20: Parâmetros de transporte da adsorção de AC.1 em tanque agitado, $T = 10^{\circ}\text{C}$, $q_m = 2,28 \cdot 10^{-2} \text{ g}_{\text{CA}}/\text{g}_{\text{res}}$; $K_D = 3,94 \cdot 10^{-2} \text{ g/L}$. $R_p = 0,50 \text{ mm}$ (Barboza et al., 2002b).	102
Tabela 6.21: Parâmetros intrínsecos obtidos com ajuste não-linear (Barboza et al., 2002b).	104
Tabela 6.22: Módulo de Thiele e fator de efetividade para cada ensaio (Barboza et al., 2002b).	105
Tabela 6.23: Parâmetros cinéticos e de transporte da adsorção de AC.3 em tanque agitado. (Barboza et al. 2002c)	106
Tabela 6.24: Parâmetros cinéticos de transporte da dessorção de AC.3 em tanque agitado. $T = 30^{\circ}\text{C}$ e $\text{pH} = 6,2$. (Barboza et al. 2002c)	108
Tabela 6.25: Parâmetros utilizados nas simulações (Almeida et al., 2001).	108
Tabela 6.26: Condições de operação (Almeida et al., 2001).	109
Tabela 6.27: Resultados obtidos para o rendimento (Y), fator de purificação (FP) e fator de concentração (FC). (Almeida et al., 2001).	110

Tabela 6.28: Resultados experimentais e simulados de rendimento (Y), fator de purificação (FP) e fator de concentração (FC) e a diferença entre os resultados experimentais e simulados (e) (Almeida et al., 2003a).	112
Tabela 6.29: Matriz de planejamento utilizada na otimização do parâmetro Y do processo contínuo de adsorção de AC.	114
Tabela 6.30: Análise de variância para ajuste do modelo linear para Y.	118
Tabela 6.31: Intervalos das variáveis que otimizam o rendimento (Y).	124
Tabela 6.32: Análise de variância para ajuste do modelo linear para FC.	126
Tabela 6.33: Intervalos das variáveis que otimizam o fator de concentração.	134
Tabela 6.34: Análise de variância para ajuste do modelo linear para FP.	136
Tabela 6.35: Intervalos das variáveis que otimizam o fator de purificação.	144
Tabela 6.36: Valores ótimos obtidos para operação do sistema contínuo que maximizam Y, FC e FP.	145
Tabela 6.37: Parâmetros utilizados na simulação e no ensaio.	146
Tabela 6.38: Condições de operação do ensaio contínuo.	146
Tabela 6.39: Resultados experimentais e simulados de rendimento (Y), fator de purificação (FP) e fator de concentração (FC) e a diferença entre os resultados experimentais e simulados (e).	147
Tabela 6.40: Condições de operação e resultados dos experimentos em leito fixo (Almeida et al. 2003b).	148

NOMENCLATURA

sub-índice: 0: inicial;
1: 1º estágio;
2: 2º estágio;
sobre índice: $\bar{\quad}$: média.

A: fator de frequência, T^{-1}

AC: ácido clavulânico

AC.1: ácido clavulânico puro

AC.2: ácido clavulânico do produto farmacêutico Clavulin®

AC.3: ácido clavulânico proveniente de fermentação

a: coeficiente de equilíbrio para monocamada do modelo de BET, -

b: coeficiente de equilíbrio para multicamada do modelo de BET, -

Bi: número de Biot, -

$C = C_{\text{bulk}}$: concentração no seio do fluido, ML^{-3}

C^* : concentração de equilíbrio, ML^{-3}

C_b : concentração de ruptura, ML^{-3}

C_{bulk} : concentração no “bulk”, ML^{-3}

C_e : concentração de equilíbrio, ML^{-3}

C_E : concentração de eluente, ML^{-3}

C_s : concentração na superfície da partícula, ML^{-3}

C_T : concentração de contaminantes, ML^{-3}

C_i : concentração no interior da biopartícula ao longo de r , ML^{-3}

D_{ef} : difusividade efetiva de AC nos poros da resina, L^2T^{-1}

E_a : energia de ativação, $KJmol^{-1}$

e : parâmetro de convergência do método dos poliedros flexíveis, -

F_i : vazão de alimentação, L^3T^{-1}

FC: fator de concentração, -

FP: fator de purificação, -

F_r : vazão de reciclo, L^3T^{-1}

- k: constante de degradação, T^{-1}
- k_1 : constante cinética de adsorção, $M^{-1}L^3T^{-1}$
- k'_1 : constante cinética de adsorção do modelo puramente intrínseco, $M^{-1}L^3T^{-1}$
- k_2 : constante cinética de dessorção (1º estágio), T^{-1}
- k'_2 : constante cinética de dessorção do modelo puramente intrínseco, T^{-1}
- k_3 : constante cinética de dessorção (2º estágio), T^{-1}
- k_a : constante parcial de hidrólise ácida, T^{-1}
- k_b : constante parcial de hidrólise básica, T^{-1}
- k_n : constante parcial de hidrólise neutra, T^{-1}
- k_R : constante cinética intrínseca, $M^{-1}L^3T^{-1}$
- k_S : coeficiente de transferência de massa, LT^{-1}
- K_D : constante de equilíbrio de Langmuir, ML^{-3}
- K_f : constante de equilíbrio de Freundlich, $(ML^{-3})^{(1-n)}$
- K_2 : constante de equilíbrio da isoterma linear, ML^{-3}
- m: massa, M
- m_{res} : massa de resina, M
- n: índice da isoterma de Freundlich, -
- N: número de pontos de colocação, -
- n_c : número de camadas descrito pela isoterma de BET, -
- q^* : quantidade adsorvida em equilíbrio, MM^{-1}
- q_i : fração adsorvida ao longo de r, MM^{-1}
- q_m : capacidade máxima de adsorção, MM^{-1}
- r: posição radial, -
- R: raio da partícula, L
- rq_i : velocidade de adsorção na partícula, $MM^{-1}T^{-1}$
- T: temperatura, θ
- t: tempo, T
- t_b : tempo de ruptura, T
- V_i : volume de líquido, L^3
- V_S : volume de sólidos, L^3
- v_{obs} : velocidade observada, $ML^{-1}T^{-1}$
- w_j : pesos da quadratura, -
- Y: rendimento, -

Letras Gregas

Δ : variação, -

ε_r : fração líquida do sistema, -

ε_p : porosidade da resina, -

φ_{obs} : módulo de Thiele, -

Φ : soma dos erros ao quadrado, ML^{-3}

η : fator de efetividade, -

μ : força iônica, -

θ_{ri} : tempo de residência do reator, T

θ_{si} : tempo de residência de sólidos, T

RESUMO

O ácido clavulânico (AC), um antibiótico beta-lactâmico, vem se destacando por sua importância terapêutica e comercial. Esse antibiótico é produzido por um actinomiceto, *Streptomyces clavuligerus*, e tem seu uso combinado com penicilinas, agindo como inibidor das enzimas beta-lactamases. Devido a esta importância, alguns trabalhos sobre o estudo da produção de ácido clavulânico vêm sendo desenvolvidos no DEQ-UFSCar. Como seqüência natural desses trabalhos, tornou-se necessário o desenvolvimento de um trabalho sobre purificação de ácido clavulânico. Dentre os processos de recuperação de antibióticos destaca-se o processo de adsorção.

No presente trabalho foi proposto o estudo do processo contínuo de purificação de ácido clavulânico por adsorção, utilizando para tal dois reatores de mistura (CSTR) com reciclo de resina. O adsorvente escolhido para esse processo foi a resina de troca iônica Amberlite IRA 400 no ciclo cloreto. Inicialmente foi necessário fazer um estudo cinético de adsorção e dessorção e das isothermas de equilíbrio do AC nessa resina, investigando a influência de fatores como concentração inicial de AC, temperatura e pH. A velocidade de degradação do ácido clavulânico é bastante alta principalmente em regiões básicas e ácidas; temperaturas altas também aumentam a velocidade de degradação deste composto. Portanto, foi necessária a realização de um estudo de degradação nas condições de temperatura e pH utilizadas no estudo cinético de adsorção. O processo de adsorção e dessorção em batelada pôde ser simulado através de um modelo matemático, obtendo-se os parâmetros cinéticos e de transporte envolvidos na adsorção. Uma modelagem matemática para o processo contínuo também foi proposta visando a obtenção de dados preliminares para realização de experimentos contínuos de adsorção de AC. Os parâmetros utilizados no processo contínuo foram otimizados através da análise por superfície de resposta de forma a maximizar o rendimento e os fatores de concentração e purificação. Os ensaios do processo de adsorção contínua foram realizados. Esse processo mostrou-se operacionalmente viável apesar de se obter fatores de concentração e purificação menores que aqueles obtidos no processo em leito fixo.

Studies on clavulanic acid purification utilizing continuous process of adsorption

ABSTRACT

Clavulanic acid (CA), a beta-lactam antibiotic, has been known for its commercial and therapeutic importance. This antibiotic is produced by an actinomycete, *Streptomyces clavuligerus*, and has a combined use with penicillins, acting as inhibitor of beta-lactamase enzymes. Due this importance, some studies on clavulanic acid production has been developed at DEQ-UFSCar. As a natural consequence of these studies and the global knowledge of this process it was necessary to develop a work studying clavulanic acid purification. The adsorption process was chosen to be studied as the process of clavulanic acid recovery and purification.

In the present work a continuous adsorption process for clavulanic acid purification was proposed. This process utilized two stirred tanks (CSTR) with recycle of the adsorbent material. The adsorbent chosen to this process was the ion exchange resin Amberlite IRA 400 in the chloride cycle. First, it was necessary to study the adsorption and desorption kinetics and the clavulanic acid equilibrium isotherms in that resin to investigate the influence of temperature, pH and clavulanic acid initial concentration. The degradation rate of clavulanic acid in basic and acidic solutions is very high; high temperatures also increase the degradation rate. Consequently, studies on clavulanic acid degradation were carried out in the same temperature and pH conditions of the kinetics studies. A mathematical model was proposed to describe the adsorption and desorption processes and the kinetics and transport parameters were determined. The continuous process was also mathematically modeled to obtain preliminary data to carry out the clavulanic acid continuous experiments. The parameters utilized in the continuous adsorption process were optimized by response surface analysis to maximize yield and concentration and purification factors. Experiments of the continuous adsorption process were carried out in some different conditions. The continuous process like proposed was operationally viable, but the concentration and purification factors obtained were lesser than those obtained in fixed-bed experiments.

1 INTRODUÇÃO

Os antibióticos são compostos orgânicos produzidos em fermentações como metabólitos secundários de microrganismos específicos. A importância dos antibióticos como produtos farmacêuticos reside no fato de possuírem capacidade de inibir o crescimento de microrganismos patogênicos e, conseqüentemente, são usados no combate à infecções em seres humanos e animais (Belter, 1985). Existe uma grande variedade desses compostos que podem ser classificados segundo seu espectro de ação antimicrobiana, microrganismo produtor, mecanismos de atividade, rota biossintética e estrutura molecular.

A resistência bacteriana aos antibióticos é atualmente um dos principais fatores que dificultam o uso desses agentes quimioterápicos no controle de doenças infecciosas. O ácido clavulânico (AC) é um composto beta-lactâmico com baixa atividade antimicrobiana, porém é um potente inibidor de enzimas beta-lactamases. Essas enzimas têm a capacidade de hidrolisar o anel beta-lactâmico, tornando os microrganismos que as produzem resistentes a ação de antibióticos beta-lactâmicos. O ácido clavulânico tem a propriedade de inibir a produção dessas enzimas, podendo ser administrado juntamente com esses antibióticos (Nabais e Cardoso, 1995).

O crescente interesse das indústrias farmacêuticas pelos vários antibióticos beta-lactâmicos nas últimas décadas tem exigido o aperfeiçoamento dos métodos de produção através da modificação das características do processo de produção, linhagem microbiológica e das técnicas de separação e purificação. A separação desses antibióticos pode envolver vários métodos de extração e purificação que tem um importante papel no custo global do processo (Ghosh et al. 1996).

Um dos processos de isolamento do ácido clavulânico a partir de caldos fermentativos consiste em filtração ou microfiltração do caldo para separação sólido-líquido, concentração do filtrado, extração direta do filtrado concentrado com solvente orgânico, produzindo uma fase orgânica contendo o AC, e isolamento do AC do solvente orgânico. Outros processos envolvem técnicas de adsorção em resinas

poliméricas hidrofóbicas ou de troca iônica (Mayer et al., 1996). O ácido clavulânico porém, não possui nenhum grupo fortemente hidrofóbico e apresenta velocidades de degradação elevadas em regiões básicas, pH acima de 7,5, e em regiões ácidas, pH abaixo de 4,5 (Bersanetti et al., 2000). Esse fato leva a baixos rendimentos de recuperação, durante os processos de purificação convencionais quando comparados com outros compostos beta-lactâmicos (Mayer et al., 1997). Além disso, uma das grandes limitações das técnicas envolvidas no processo de separação está na aplicação em escala industrial, pois essas técnicas envolvem grandes volumes de operação e a capacidade de recuperação é relativamente baixa. Assim, a escolha de um processo viável e dos reagentes adequados a serem utilizados, levando-se em conta a sua reutilização, são determinantes para implementação de um processo de purificação que vise o baixo custo de produção.

Tendo em vista a grande importância dos antibióticos beta-lactâmicos e por sua vez do ácido clavulânico, tanto no aspecto terapêutico quanto econômico, vários trabalhos na Área de Pesquisa de Engenharia Bioquímica do DEQ-UFSCar foram desenvolvidos visando sua produção em processos convencionais e não convencionais (Batista-Neto, 2000; Gouveia, 2001; Rosa, 2002; Cassiano-Filho, 2003). Portanto, a realização de estudos de processos de separação e purificação de ácido clavulânico foi considerada de fundamental importância para o desenvolvimento do processo em sua totalidade. Esses estudos deram início na Área de Pesquisa de Engenharia Bioquímica do DEQ-UFSCar com os trabalhos do pesquisador Marlei Barboza (Barboza et al., 2000; Barboza et al., 2002a) e o mestrado de Hirata (2003). Porém, a literatura sobre os processos de separação e purificação de ácido clavulânico ainda é pouco conclusiva no que diz respeito aos resultados obtidos e aos processos a serem utilizados para esta finalidade. Assim, um trabalho mais completo sobre o assunto é de grande importância para os estudos dos processos de separação e purificação na área de Engenharia Bioquímica.

Através deste trabalho resolveu-se desenvolver o processo contínuo não convencional de separação e purificação de ácido clavulânico proveniente de caldos de fermentação obtidos utilizando-se tanque agitado e aerado com microrganismo *Streptomyces clavuligerus*. A separação e purificação foram feitas utilizando-se o princípio de adsorção através de um processo contínuo com o qual pretendia-se obter bons rendimentos e altos fatores de concentração e purificação do antibiótico.

Para uma boa compreensão a respeito do processo contínuo de adsorção do ácido clavulânico na resina hidrofóbica e de troca iônica propostas neste trabalho, foi necessário conhecer as cinéticas de adsorção e dessorção envolvidas no processo. Assim, foram realizados estudos cinéticos preliminares de adsorção e dessorção em tanque agitado e estudos para determinação das isothermas de equilíbrio do ácido clavulânico nestas resinas em várias condições de concentração inicial de AC, pH e temperatura. O adsorvente escolhido durante esses estudos foi a resina de troca iônica Amberlite IRA 400 no ciclo cloreto. Devido às altas velocidades de degradação do AC, a cinética de degradação desse antibiótico também foi investigada, mantendo-se o pH em torno de 6,0 e variando-se a temperatura dentro da faixa utilizada no estudo de adsorção. Os estudos cinéticos e de degradação foram realizados tanto com o ácido clavulânico puro, quanto com o ácido clavulânico proveniente da fermentação do microrganismo *Streptomyces clavuligerus* ATCC 27064. Nas fermentações foi utilizado meio complexo contendo glicerol como fonte de carbono e Samprosoy 90 NB com fonte de nitrogênio (Rosa et al., 2001).

O processo de adsorção e dessorção em batelada pôde ser modelado matematicamente e os dados gerados pelo modelo foram comparados aos dados experimentais. Por esse modelo foram obtidos os parâmetros cinéticos e de transporte envolvidos no processo de adsorção. Uma modelagem matemática para o processo contínuo também foi utilizada, com base no modelo proposto por Barboza (1998), visando a obtenção de dados preliminares para realização de experimentos contínuos de adsorção de AC. Os parâmetros utilizados no processo contínuo foram otimizados através da análise por superfície de resposta de forma a maximizar os parâmetros rendimento e fatores de concentração e purificação. A parte experimental referente à operação do processo contínuo foi realizada em reatores de mistura (CSTR) com reciclo do material adsorvente. O processo contínuo de adsorção de ácido clavulânico foi, por fim, comparado com o processo em leito fixo.

A conclusão deste trabalho finaliza uma etapa inicial de pesquisa sobre a purificação de ácido clavulânico, dando início a uma nova etapa que visa a propor uma seqüência para o processo global de produção e separação deste antibiótico. Todos os resultados obtidos são de grande importância para aplicação em trabalhos futuros de pesquisa nesta área, para ampliação de escala do processo e também para o conhecimento científico/tecnológico, visto que não se encontram tais trabalhos na literatura.

Para melhor esclarecer os objetivos do presente trabalho pode-se citar que este teve por objetivo principal estudar a purificação de ácido clavulânico produzido por fermentação utilizando-se o processo contínuo de adsorção. Para atingir esse objetivo vários outros objetivos tiveram que ser atingidos, tais como:

- ❖ escolha do adsorvente adequado para o processo de adsorção;
- ❖ realização de estudo cinético preliminar de adsorção e dessorção;
- ❖ determinação dos parâmetros de equilíbrio de adsorção a partir das isothermas de equilíbrio;
- ❖ realização de estudo cinético de degradação do AC nas condições de pH e temperatura utilizadas no processo de adsorção;
- ❖ modelagem e simulação do processo em batelada para determinação dos parâmetros cinéticos e de transporte;
- ❖ modelagem e simulação do processo contínuo para verificar o desempenho do processo na purificação de AC;
- ❖ experimentos em processo contínuo para validação do modelo matemático;
- ❖ otimização de parâmetros utilizados no processo contínuo;
- ❖ e por fim, comparar o processo contínuo com processo convencional em leito fixo.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS

A antibiose é a influência prejudicial na interação de um microrganismo com outro. Durante esse processo alguns microrganismos produzem substâncias chamadas antibióticos. Os antibióticos têm portanto, a capacidade de, em doses reduzidas, inibir o crescimento ou destruir microrganismos (Aquarone et al., 1975).

A família dos antibióticos beta-lactâmicos constitui o grupo mais importante dentre esses fármacos, tanto no que diz respeito a sua utilização clínica quanto do ponto de vista econômico. Segundo Ghosh et al. (1996), cerca de 60% do total de antibióticos produzidos no mundo são antibióticos beta-lactâmicos. Esses antibióticos estão subdivididos em cinco grupos distintos, mostrados na Tabela 2.1. Todos esses grupos, com exceção dos monobactâmicos, são formados por um sistema bicíclico de anéis. Dentre esses grupos destacam-se o grupo das penicilinas e o das cefalosporinas tanto na forma natural quanto nos seus derivados semi-sintéticos (O'Sullivan e Sykes, 1986).

Durante os estudos para o desenvolvimento de um processo eficiente de isolamento e purificação de penicilina, Abraham e Chain (1940, apud Baggaley et al., 1997) descobriram que algumas bactérias produziam uma enzima capaz de inativar a ação antibiótica das penicilinas. A enzima foi denominada inicialmente de penicilinase, e atualmente as diversas enzimas desse grupo são chamadas de beta-lactamases. Devido ao grande número dessas enzimas existentes, elas foram classificadas de acordo com a similaridade de seqüência, seletividade pelo substrato e outros parâmetros bioquímicos. A Tabela 2.2 apresenta uma classificação dessas enzimas. As enzimas da Classe A são mais seletivas para a penicilina hidrolisando seu anel beta-lactâmico resultando em derivados de ácido penicilóico. Enquanto que as beta-lactamases da Classe C agem da mesma forma, porém preferencialmente para a cefalosporina (Baggaley et al., 1997). A

reação de hidrólise da penicilina pela enzima beta-lactamase pode ser visualizada na Figura 2.1.

Tabela 2.1: Estrutura básica dos grupos de antibióticos beta-lacâmicos e seus principais microrganismos produtores.

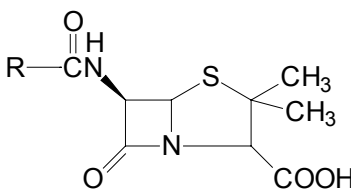
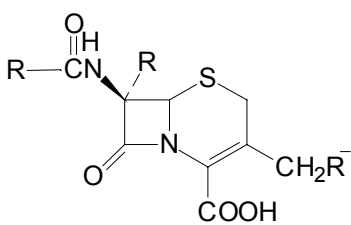
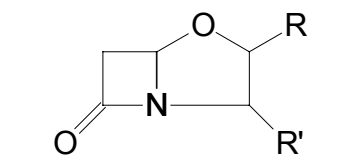
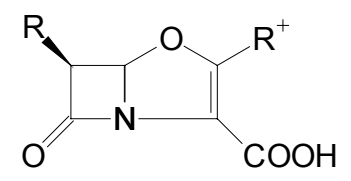
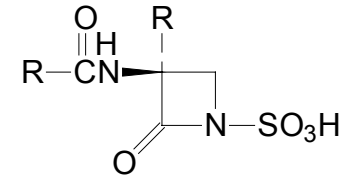
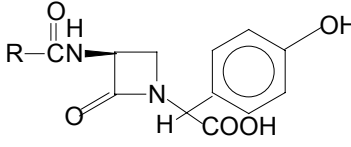
Estruturas químicas básicas	Antibióticos	Principais microrganismos produtores
<p>Penam</p> 	Penicilinas	<p><i>Penicillium chrysogenum</i> <i>Aspergillus nidulans</i> <i>Cephalosporium acremonium</i> <i>Streptomyces clavuligerus</i></p>
<p>Ceph-3-em</p> 	Cefalosporinas	<p><i>Cephalosporium acremonium</i> <i>Nocardia lactamdurans</i></p>
<p>Clavam</p> 	Ácido clavulânico	<p><i>Streptomyces clavuligerus</i></p>
<p>Carbapenem</p> 	Tienamicinas Ácidos olivânicos	<p><i>Streptomyces cattleya</i> <i>Streptomyces olivaceus</i></p>
<p>Monolactam</p> 	Monobactâmicos	<p><i>Glunobacter</i> sp. <i>Pseudomonas acidophila</i> <i>Acetobacter</i> sp.</p>
	Norcadicinas	<p><i>Nocardia uniformis</i></p>

Tabela 2.2: Classificação das beta-lactamases (Ambler et al., 1980 apud Baggaley et al., 1997).

Classe	Espécie	Sítio ativo	Microrganismos produtores
A	Penicilinas	Resíduo de serina	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Escherichia coli</i>
B	Metallo-enzimas	Metal (Zn)	<i>Bacillus cereus</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
C	Cefalosporinas	Resíduo de serina	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Escherichia coli</i>
D	Oxaciloinases	Resíduo de serina	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Escherichia coli</i>

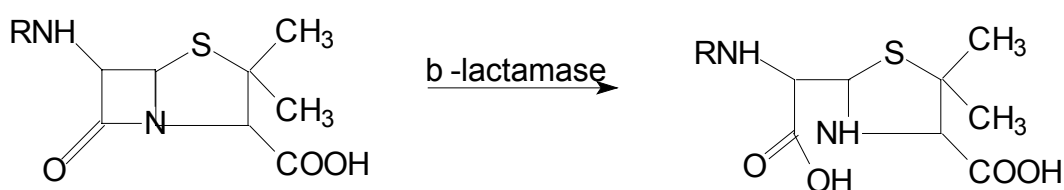


Figura 2.1: Reação de hidrólise da penicilina pela enzima beta-lactamase (Coleman et al., 1994).

A proliferação de bactérias capazes de produzir as enzimas beta-lactamases levou os pesquisadores a procurar alternativas para o tratamento de doenças causadas por essas bactérias. Este problema foi originalmente enfrentado pelo desenvolvimento de diversas penicilinas menos susceptíveis à ação das beta-lactamases. Similarmente, um grande número de cefalosporinas semi-sintéticas foi produzido a partir da cefalosporina C. Durante as pesquisas em busca desses novos antibióticos foram isolados microrganismos capazes de produzir inibidores de beta-lactamases, dentre eles o actinomiceto *Streptomyces clavuligerus* (Coleman et al., 1994). Culturas desse microrganismo produziam, além de vários produtos de metabolismo secundário, tais como penicilina N e cefamicina C, um composto com alta atividade inibitória de beta-lactamases. Esse composto foi denominado ácido clavulânico (Reading e Cole, 1977).

2.2 ÁCIDO CLAVULÂNICO

O ácido clavulânico (AC) é um composto com estrutura beta-lactâmica, produzido por uma bactéria filamentosa denominada *Streptomyces clavuligerus*. Essa bactéria produz, juntamente com o ácido clavulânico, pelo menos mais 20 metabólitos

secundários, incluindo outros antibióticos beta-lactâmicos, e não é capaz de metabolizar a glicose. A descoberta do ácido clavulânico foi publicada em 1976 pelo laboratório inglês Beecham (Brown et al., 1976). Sua estrutura química pode ser observada através da Figura 2.2.

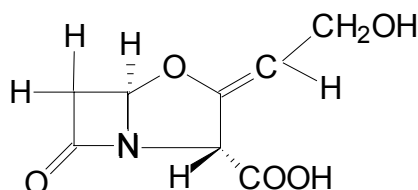


Figura 2.2: Estrutura química do ácido clavulânico (AC) (Reading e Cole, 1977).

O AC é ativo contra um grande número de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, mas essa atividade é relativamente baixa com relação a atividade de outros antibióticos. Portanto o AC não pode ser usado como único produto no combate às bactérias patogênicas. A principal característica do ácido clavulânico é ser um potente inibidor de enzimas beta-lactamases produzidas por bactérias patogênicas resistentes a outros antibióticos beta-lactâmicos. Como resultado, em presença de baixas concentrações de ácido clavulânico, muitas dessas bactérias produtoras de beta-lactamases tornam-se tão sensíveis às penicilinas e cefalosporinas comercialmente disponíveis quanto outros microrganismos não produtores de beta-lactamases (Brown et al., 1976). Atualmente a combinação de ácido clavulânico com o antibiótico amoxicilina, produto farmacêutico Clavulin® comercializado no Brasil, é um exemplo bem sucedido do uso de antibióticos beta-lactâmicos tradicionais junto com uma substância inibidora de beta-lactamase (Mayer e Deckwer, 1996).

A rota biossintética do ácido clavulânico não foi ainda totalmente elucidada, apesar de muitos intermediários e enzimas envolvidas já terem sido identificados. Alguns autores mostraram que a proteína da soja é o nutriente mais importante da produção do ácido clavulânico e o glicerol deve ser usado como fonte de carbono (Butterworth, 1984; Mayer e Deckwer, 1996).

Os processos de separação e purificação de AC a partir do caldo de fermentação envolvem uma série de etapas, tais como filtração e centrifugação para separação de células e técnicas de extração e/ou adsorção para posterior purificação do antibiótico. O ácido clavulânico porém não possui nenhum grupo fortemente hidrofóbico e apresenta velocidades de degradação elevadas em regiões básicas, pH acima de 7,5, e também em

regiões ácidas, pH abaixo de 4,5 (Bersanetti et al., 2000). Isso leva a baixos rendimentos de recuperação durante os processos de purificação quando comparados a outros compostos beta-lactâmicos (Mayer et al., 1997). Dessa forma, para planejar e otimizar o processo de purificação do ácido clavulânico, deve-se fazer também uma investigação da sua cinética de degradação nas condições de temperatura e pH utilizadas nestes processos.

2.3 RECUPERAÇÃO DE PRODUTOS BIOTECNOLÓGICOS

O crescente interesse do mercado por vários produtos biotecnológicos, dentre os quais destacam-se os antibióticos beta-lactâmicos, tem provocado grandes investimentos no aperfeiçoamento dos métodos de produção e recuperação desses produtos, visto que essa recuperação equivale a cerca de 50% do total dos custos de produção do antibiótico (Ghosh et al., 1996).

Bjurstrom (1985) descreveu “downstream processing” como um conjunto de operações unitárias que visam a separação de produtos biotecnológicos. Normalmente uma planta de recuperação de um determinado produto envolvendo essas operações representa um grande investimento pois os equipamentos utilizados para cada operação ocupam grandes espaços físicos e apresentam alto custo. Conseqüentemente, o custo de separação é uma fração substancial do custo total do produto final. Por isso, os processos de recuperação e purificação devem ser muito bem entendidos e planejados.

Da experiência, pode-se concluir que a maior parte dos processos de bioseparação consiste em quatro passos básicos que ocorrem seqüencialmente (Ward, 1991):

1. Remoção de Insolúveis – os processos mais utilizados são filtração e/ou centrifugação, nessa etapa não ocorre grande concentração do produto nem grande melhora na sua qualidade, porém ocorre o descarte de células se o produto for extracelular ou a recuperação das mesmas se o produto for intracelular ou a própria célula.
2. Isolamento do Produto – também denominado de isolamento primário, remove produtos com propriedades divergentes comparado com o produto desejado, com aumento significativo da concentração. As principais operações são extração com solvente ou de duas fases aquosas e adsorção.

3. Purificação – concentra bastante o produto removendo impurezas com propriedades similares a este. Cromatografia, eletroforese e precipitação são bons exemplos de processos utilizados na purificação.

4. Refinamento – também denominado de isolamento final. O uso final do produto indica o método a ser utilizado. Esses processos podem ser cristalização, secagem, liofilização, entre outros.

Essa classificação não é muito rígida, pois diferentes autores podem considerar o mesmo processo em diferentes categorias. Aos produtos intracelulares ainda é adicionado o método de ruptura celular para extrair o produto do microrganismo.

A adsorção pode ser utilizada em várias etapas do processo de separação e purificação destacando-se como uma das principais técnicas a ser conhecida e aplicada. Ao se utilizar o processo de adsorção para recuperação de produtos deve-se buscar simplicidade operacional e adequada seleção do adsorvente, levando-se em conta a sua reutilização por um método de regeneração apropriado para diminuir os custos com o mesmo.

2.4 PROCESSO DE ADSORÇÃO

O processo de recuperação de antibióticos envolve vários métodos de extração e purificação dentre os quais destaca-se o processo de adsorção. Gubulin (1990) descreve o processo de adsorção como um fenômeno em que uma fase fluida (adsorptivo) é colocada em contato com uma fase sólida (adsorvente) e na interface de separação entre as duas fases ocorre uma fonte de atração entre o adsorvente e algumas das espécies químicas presentes na fase fluida (adsorbato). Essa interface apresenta-se portanto como um “concentrador” dessas espécies químicas da fase fluida.

2.4.1 TIPOS DE ADSORÇÃO

O processo de adsorção pode ser subdividido em quatro tipos: adsorção física ou fisissorção, adsorção química ou quimissorção, adsorção de troca iônica e adsorção específica que pode ser por bioafinidade ou por exclusão de tamanho. A adsorção física ocorre apenas e unicamente em função de um campo de forças de natureza física entre o adsorvente e o adsorbato. Estas forças, usualmente denominadas de forças de van der

Waals, são de intensidade fraca ou moderada. O equilíbrio é usualmente fraco e reversível, uma vez que a energia requerida para a dessorção é pequena. A adsorção química, por sua vez, envolve a reação entre um adsorbato e um adsorvente resultando em uma mudança na forma química do adsorbato. A quimissorção resultante é mais forte que a fisissorção, ocorrendo liberação de calor semelhante aos valores liberados em uma reação química. Esse processo geralmente necessita de uma energia de ativação (altas temperaturas) e freqüentemente é um processo irreversível (Slejko, 1985).

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 subsequenteiramente eluídos, por deslocamentos por outros íons, com o mesmo tipo de carga, porém com maior força de interação com a fase estacionária. O mecanismo de ação de um trocador iônico está resumido na Figura 2.3. Nesta Figura pode-se observar que o trocador catiônico está em equilíbrio com o eluente inicial contendo íons X^+ . A) B^+ e C^{2+} são materiais a serem separados. Quando uma determinada quantidade de tais amostras é colocada em contato com o trocador ocorre a adsorção, liberando uma quantidade equivalente dos íons X^+ . B) Após a adsorção é aplicado um eluente, que contém íons Z^+ com uma afinidade um pouco maior pelos grupos trocadores da matriz. Estes íons vão provocar a liberação da substância B^+ , ligada mais fracamente a matriz que a substância C^{2+} . C) Passando a seguir o segundo eluente, contendo íons W^+ com maior afinidade ainda pela matriz que o material C^{2+} . D) O efeito dos íons de maior afinidade relativa a X^+ , isto é, Z^+ e W^+ , pode também ser conseguido por concentrações crescentes de X^+ , alterando o equilíbrio entre a fase móvel e a fase estacionária. Para a coluna ser novamente utilizada ela deve ser regenerada, ou seja, equilibrada com o eluente inicial (Collins et al., 1995).

A adsorção específica pode ser por bioafinidade ou por exclusão. A adsorção por bioafinidade, Figura 2.4, 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. A adsorção por exclusão promove uma seletiva e dinâmica distribuição das moléculas do soluto entre duas fases líquidas separadas, e dependentes de uma estrutura estacionária contendo poros de tamanhos controlados. Este tipo de adsorção também é conhecido como filtração em gel, permeação em gel, ou cromatografia em peneira molecular de difusão restrita.

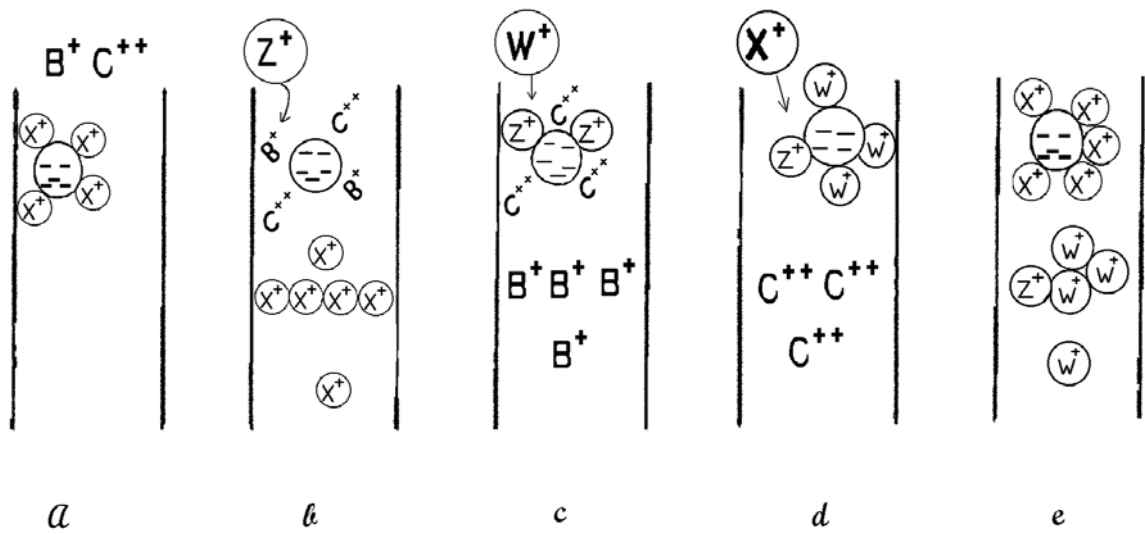


Figura 2.3: Esquema do mecanismo de troca iônica (Collins et al., 1995).

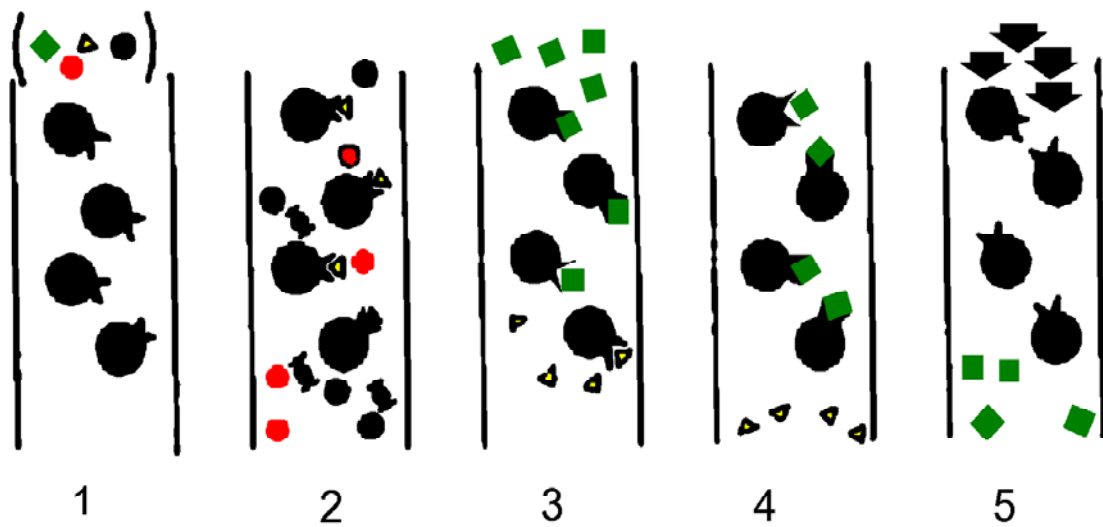


Figura 2.4: Esquema do princípio da adsorção por bioafinidade (Collins et al., 1995).

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. Esses

adsorventes foram desenvolvidos recentemente para oferecer uma força mecânica necessária à adsorção, além de serem providos de alta área superficial e tamanho de poros apropriados para um rápido transporte (Belter, 1985). Para as resinas de troca iônica são fixados grupos iônicos por uma ou mais reações químicas. Os trocadores iônicos classificam-se em: aniônicos, que trocam ânions e portanto tem grupos funcionais positivos ligados à matriz como por exemplo sal de amônio quaternário; e catiônicos, que trocam cátions e apresentam grupos funcionais negativos ligados à matriz. A representação desses tipos de trocadores podem ser visualizadas na Figura 2.5.



Figura 2.5: (a) Esquema de um trocador catiônico; (b) Esquema de um trocador aniônico (Collins et al., 1995).

2.4.3 EQUILÍBRIO DE ADSORÇÃO

A adsorção de uma substância, presente em uma fase, na superfície de outra fase em um sistema específico leva a uma distribuição definida termodinamicamente desta substância entre as fases quando o sistema atinge o equilíbrio. Uma maneira comum de descrever essa distribuição é expressar a quantidade de substância adsorvida por quantidade de adsorvente (q^*) como uma função da concentração de adsorbato (C^*) em solução. Uma expressão desse tipo é denominada isoterma de adsorção. A Figura 2.6 mostra alguns tipos de isotermas.

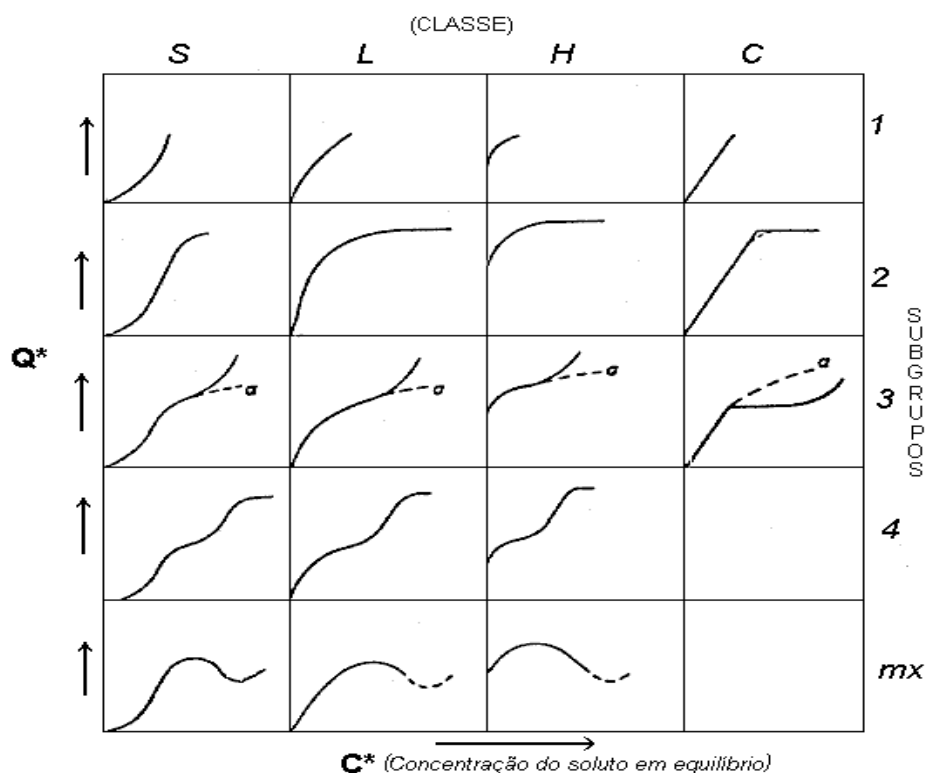


Figura 2.6: Tipos de isotermas de adsorção (Giles et al., 1960).

As isotermas do tipo S aparecem quando a molécula do soluto é razoavelmente hidrofóbica, existe competição das moléculas do solvente ou outras moléculas pelo sítio do sólido adsorvente e ocorrem fracas interações entre soluto e solvente. As isotermas do tipo L mostram a dificuldade de preencher sítios vagos e a fraca interação entre as moléculas do solvente e os sítios do adsorvente. As isotermas do grupo H aparecem quando o soluto apresenta alta afinidade pelo adsorvente, sendo completamente adsorvido pelo sólido, a parte inicial da isoterma é vertical. As isotermas representadas por curvas do tipo C caracterizam uma partição entre o soluto e o adsorvente, os poros do suporte apresentam moléculas “flexíveis” tendo regiões com diferentes graus de cristalinidade, o soluto apresenta maior afinidade pelo adsorvente que o solvente e devido à alta afinidade do soluto pelo adsorvente ocorre uma penetração mais forte, isto também é verificado por causa da geometria molecular do adsorvente dentro da região cristalina (Giles et al., 1960)

As relações de equilíbrio são apresentadas em forma de modelos que correlacionam matematicamente as quantidades adsorvidas em equilíbrio com o meio circundante. Vários desses modelos são descritos a seguir.

Modelo de Langmuir

Uma das isotermas clássicas apresentadas na literatura provém da teoria de Langmuir, que assume a formação de uma camada homogênea na superfície sólida, sem que haja interações entre as moléculas adsorvidas. A representação matemática desta isoterma é apresentada na Equação 1.

$$q^* = \frac{q_m \cdot C^*}{K_D + C^*} \quad (1)$$

onde C^* é a concentração da espécie em solução que está em equilíbrio com a fração adsorvida q^* , K_D é a constante de equilíbrio e q_m é a máxima capacidade de adsorção.

Essa isoterma assume calor de adsorção constante, um número finito de sítios e a existência de ponte de interação entre soluto-soluto, resultando em um recobrimento em monocamada. Existem ainda algumas variações desse modelo como é o caso do modelo de bi-Langmuir, representado na Equação 2 (Mayer et al., 1996). Esse tipo de modelo é utilizado quando dois tipos distintos de interação ocorre entre o adsorbato e a superfície ativa do adsorvente.

$$q^* = \frac{q_{m1} \cdot C^*}{K_1 + C^*} + \frac{q_{m2} \cdot C^*}{K_2 + C^*} \quad (2)$$

Modelo de Freundlich

A isoterma de Freundlich corresponde a adsorção em sítios não uniformes. Nesse caso o calor de adsorção frequentemente diminui com o aumento da cobertura na superfície. A falta de uniformidade pode existir previamente nos diferentes sítios de adsorção ou ser causada pelas forças repulsivas entre átomos ou moléculas adsorvidas. A Equação 3 descreve matematicamente esta isoterma.

$$q^* = K_f \cdot C^{*n} \quad (3)$$

onde K_f é a constante da isoterma de Freundlich e n é um índice desta isoterma.

Essa isoterma é bastante utilizada para descrever adsorção de antibióticos como pode ser observado na apresentação de um processo para adsorção de novobiocina e estreptomicina apresentado por Bailey e Ollis (1986).

Modelo de BET

Brunauer, Emmett e Teller estenderam o modelo de Langmuir incluindo o fenômeno de adsorção em multicamada. As principais hipóteses deste modelo é que uma dada camada não necessita estar completa antes que as camadas subseqüentes sejam formadas, que a primeira camada de moléculas aderem a superfície com energia comparável ao calor de adsorção da adsorção em monocamada. A Equação 4 descreve este modelo.

$$\frac{q^*}{C_M} = \frac{a \cdot C^* [1 - (n_c + 1)b^{n_c} \cdot C^{*n_c} + n_c \cdot b^{n_c+1} \cdot C^{*n_c+1}]}{(1 + b \cdot C^*) [1 + (a - b)C^* - a \cdot b^{n_c} \cdot C^{*n_c+1}]} \quad (4)$$

onde n_c é o número de camadas; “a” é o coeficiente de equilíbrio (relação entre a adsorção e a dessorção para a monocamada); “b” é o coeficiente de equilíbrio para todas as camadas; C_M é a quantidade adsorvida relacionada com o peso total de adsorvente para um completo recobrimento em monocamada (seria equivalente a q_m).

Modelo Linear

O modelo linear é o modelo mais simples de isotermas, que descreve uma adsorção linear descrita pela Equação 5.

$$q^* = K_2 \cdot C^* \quad (5)$$

onde K_2 é a constante da isoterma linear.

Esse modelo tem a vantagem de descrever um dado conjunto de dados de adsorção em termos de um único parâmetro, K_2 . Mas é raramente válida para grandes variações de concentração, portanto não se deve fazer extrapolações utilizando este modelo.

2.4.4 SISTEMAS DE ADSORÇÃO

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

No caso de processos biotecnológicos o processo de adsorção em leito fixo é mais comumente utilizado na indústria (Ward, 1991). Neste tipo de operação um alto grau separação e remoção é obtido sendo necessários muitos estágios no processo em batelada em tanque agitado para uma separação equivalente. O leito fixo constitui-se simplesmente de uma coluna preenchida com material adsorvente. A Figura 2.7 mostra um esquema desse tipo de coluna.

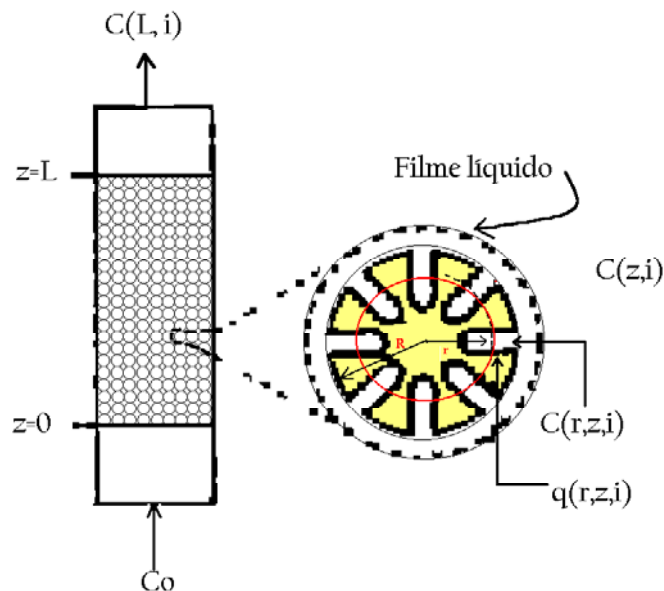


Figura 2.7: Esquema de uma coluna de leito fixo (Belter, 1985)

Na coluna de leito fixo, inicialmente, a maior parte do soluto é adsorvida, assim sua concentração no efluente deve ser zero. Na continuação do processo a concentração do soluto no efluente aumenta lentamente no início e depois abruptamente. Quando ocorre essa ruptura, “breakthrough”, o fluxo de alimentação deve ser desligado e o material adsorvido é então eluído pela lavagem do leito com solvente apropriado. As curvas de ruptura devem ser feitas para se analisar a eficiência do leito visando uma

ampliação de escala do processo. Na Figura 2.8 pode-se visualizar a curva de ruptura para adsorção em coluna de leito fixo.

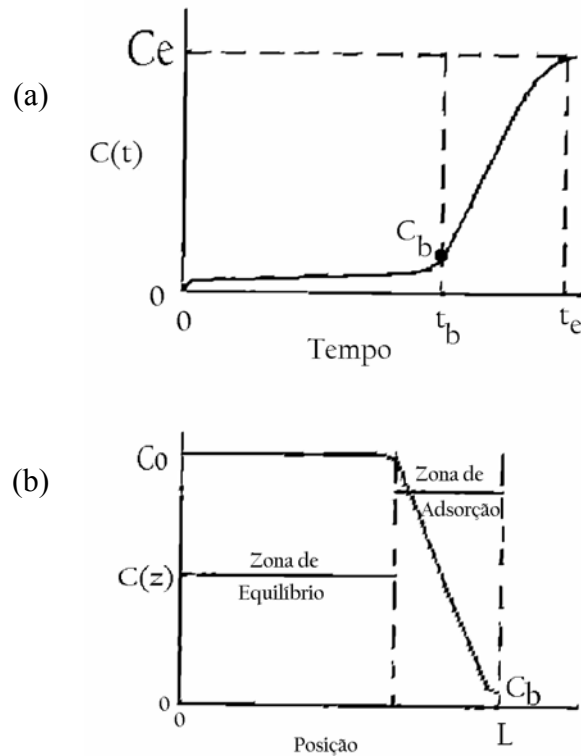


Figura 2.8: (a) Curva de ruptura para adsorção em coluna de leito fixo. C_0 é a concentração inicial de adsorbato; C_b é a concentração de ruptura; e C_e a concentração no equilíbrio. (b) Perfil de concentração ao longo da coluna no tempo de ruptura (t_b) (Belter, 1985).

O processo contínuo de adsorção é um processo alternativo constituído basicamente por dois reatores de mistura (CSTR) interligados através de reciclo. Como pode ser visto na Figura 2.9, o primeiro reator recebe continuamente material a ser purificado, ocorrendo a adsorção do composto desejado, ainda neste reator ocorre a retirada contínua de resíduo. O segundo reator é alimentado continuamente com eluente ocorrendo a eluição ou dessorção desse composto e simultânea regeneração da resina. Este processo, quando comparado com o processo em batelada, apresenta a vantagem de maximizar as transferências de massa dentro do sistema, fazendo uso mais eficiente da capacidade do adsorvente. São utilizados, portanto, em separações mais difíceis onde a seletividade é baixa e/ou a transferência de massa é lenta (Gubulin, 1990). Esse

processo, tal como descrito foi estudado por Pungor et al. (1987) e por Barboza et al. (2002a) obtendo bons resultados para purificação de beta-galactosidase e de cefalosporina C, respectivamente.

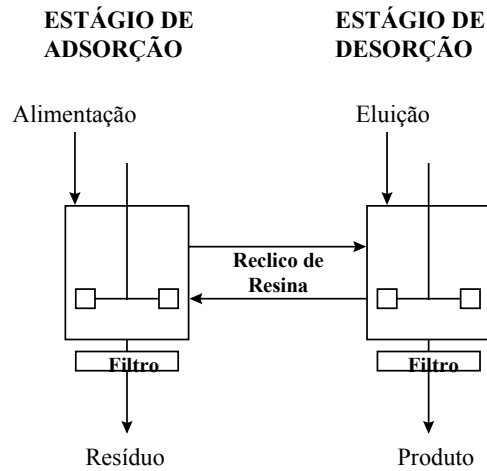


Figura 2.9: Esquema do processo contínuo.

A grande desvantagem do processo contínuo é o transporte de sólidos que é sempre problemático, devido ao entupimento de mangueiras utilizadas no bombeamento. Uma maneira de evitar os problemas mecânicos decorrentes da circulação de sólidos é a simulação de fluxos em contra-corrente utilizando leitos fixos de adsorventes e um sistema de controle que permita alternar as posições de alimentação, retirada de produto e injeção de eluente em intervalos fixos de tempo. Assim, se os leitos fixos forem suficientemente pequenos e o intervalo de tempo bem curto o processo operará praticamente como um contra-corrente contínuo. Esse processo é conhecido como leito móvel simulado e foi utilizado comercialmente pela primeira vez no processo SORBEX, utilizado industrialmente em várias separações comerciais. No processo SORBEX, que encontra-se esquematizado na Figura 2.10, a movimentação simulada do leito fixo de adsorvente é efetuada através do uso de uma válvula rotativa, que alterna continuamente os pontos de admissão e retirada de carga, eluente e produtos da coluna de adsorção. O grande sucesso comercial dos processos SORBEX, em

especial o processo PAREX para separação de para-xileno, deve-se, além da genial concepção da válvula rotativa para simulação do leito móvel, ao desenvolvimento de novos adsorventes adequados a cada separação, geralmente adsorventes de natureza zeolítica.

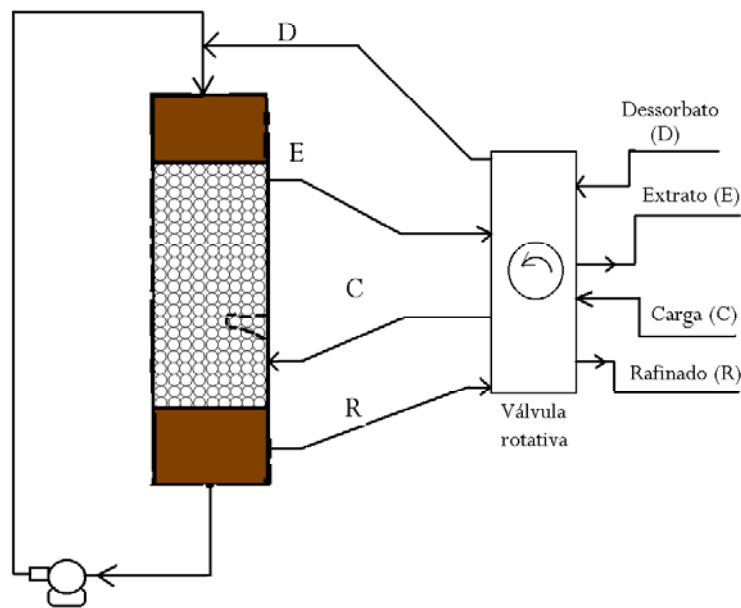


Figura 2.10: Processo SORBEX (Gubulin, 1990).

2.5 RECUPERAÇÃO DE PRODUTOS BIOTECNOLÓGICOS POR ADSORÇÃO

Na literatura é encontrada uma grande quantidade e variedade de trabalhos envolvendo estudos do processo de adsorção tanto em batelada como em processo contínuo na recuperação de produtos biotecnológicos. Essa diversidade é devida à grande quantidade de produtos que podem ser separados por adsorção e também pelos diferentes tipos de adsorventes que podem ser utilizados nesses processos. Alguns desses trabalhos serão comentados a seguir para que se tenha uma noção da diversidade de pesquisas realizadas utilizando-se o processo de adsorção.

2.5.1 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 do 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 a 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) mostrados na Figura 2.11. 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 eluição 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.

A Figura 2.11 apresenta um fluxograma do processo de recuperação de CPC descrevendo três desses estágios intermediários. Através dessa figura pode-se observar que a primeira seqüência de estágios envolve a adsorção do filtrado em uma resina fortemente trocadora de cátions, onde cátions orgânicos são retidos e o pH do meio é reduzido. A solução ácida resultante pode ser passada em uma coluna com resina fracamente trocadora de ânions. Esse procedimento pode fornecer CPC com baixas concentrações de outros ânions, pois o acetato da resina retira a maior parte dos ânions presentes nesta ficando em solução apenas a CPC.

A segunda seqüência da Figura 2.11 utiliza colunas com carvão ativado para adsorver a CPC, o meio é acidificado favorecendo a adsorção deste antibiótico. Esta etapa não é totalmente seletiva, pois outros compostos, com pesos moleculares próximos ou maiores que da CPC, são adsorvidos enquanto sais inorgânicos são retirados durante a lavagem da coluna. Soluções aquosas de álcool ou acetona podem

ser utilizadas para eluição de CPC do carvão ativado enquanto que compostos com maior peso molecular continuam adsorvidos na coluna.

Por fim, o terceiro método apresentado na Figura 2.11 utiliza resinas macroreticulares compostas de polímeros de estireno e divinilbenzeno que têm a mesma estrutura polimérica de muitas resinas trocadora de íons, não apresentando no entanto grupos ionizáveis, sendo que a adsorção ocorre por meio de forças de van der Waals. Apesar de serem usadas de maneira similar ao carvão, possuem características diferentes, como, por exemplo, a adsorção de menos impurezas de alto peso molecular. Nas três seqüências nota-se que é unânime o uso do processo de adsorção para separação de CPC. O mesmo não ocorre para o ácido clavulânico, pois o AC não é hidrofílico e também não possui nenhum grupo fortemente hidrofóbico (item 2.6)

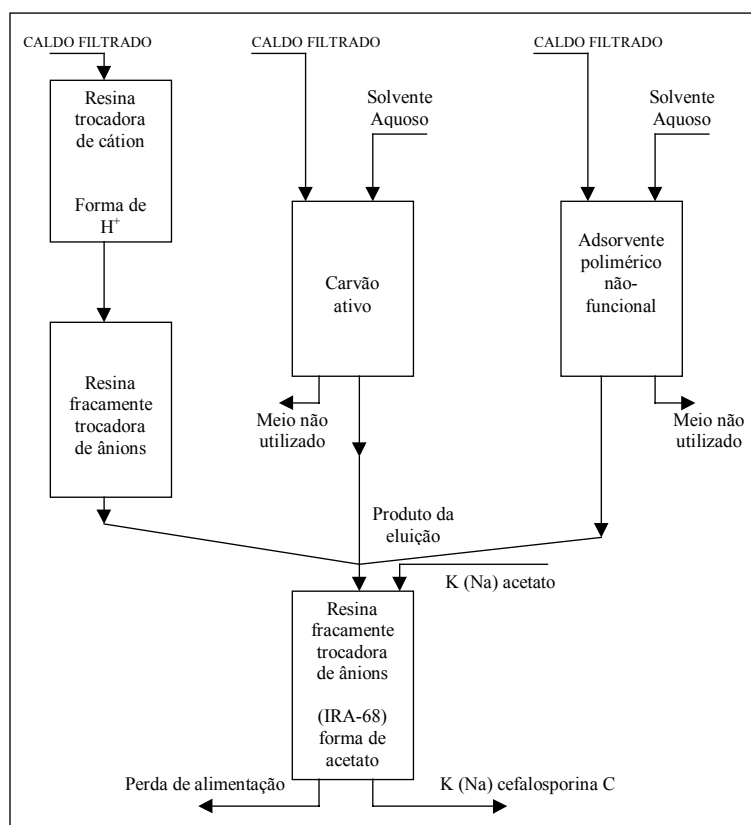


Figura 2.11: Fluxograma para vários estágios de extração em coluna da cefalosporina C (Boothroyd, 1986)

Hecht et al. (1987) investigaram o processo de recuperação *in situ* do antibiótico Myxovirescin A durante o cultivo utilizando-se o processo de adsorção em resina XAD-1180, especialmente desenvolvida para adsorção de cefalosporina. Foi desenvolvida

pelos autores uma câmara de vortex com reciclo (Figura 2.12). A adsorção ocorria nesse câmara, que permitia a passagem das células mas não a da resina. Os autores observaram que uma hora após o início do processo de adsorção a concentração do produto no fermentador decresceu de 1,95 até 0,1 mg/L permanecendo constante até o fim do processo. O aumento de antibiótico acumulado na resina correspondia à diminuição do antibiótico no fermentador. Também foi observada uma maior produtividade quando se utilizou o aparato desenvolvido e que a resina poderia ser reutilizada dentro das mesmas condições depois que o antibiótico era removido. Após três fases de adsorção cerca de 95% do antibiótico removido estava presente no eluente.

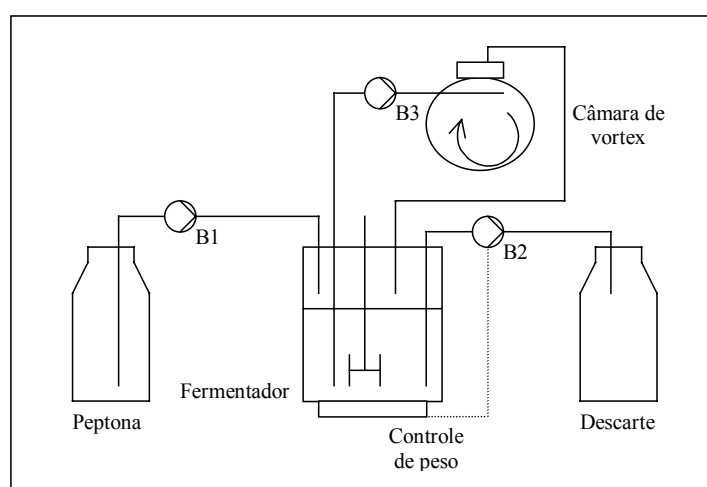


Figura 2.12: Diagrama esquemático do processo de recuperação *in situ* do antibiótico Myxovirescin A (Hecht et al., 1987). B: bombas.

Ghosh et al. (1996) descreveram processos típicos de purificação de cefalosporina C. O primeiro processo, visualizado através da Figura 2.13, 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, Figura 2.14, 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 poliaromáticos 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.

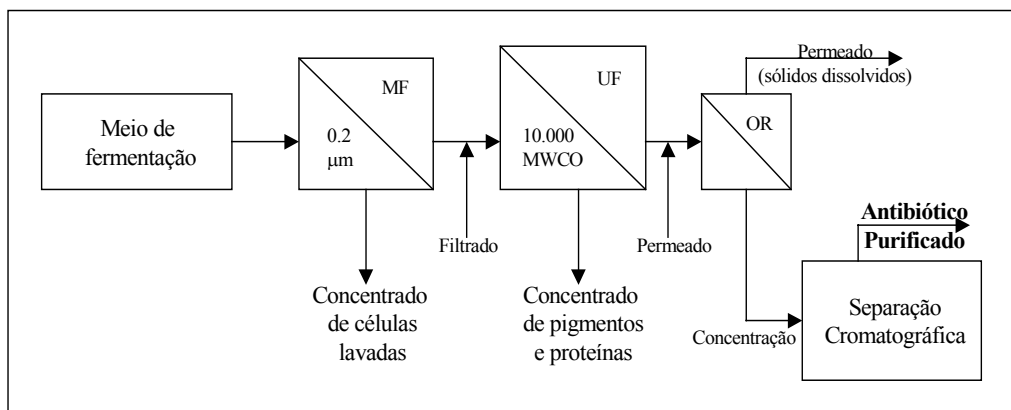


Figura 2.13: Processo de purificação de CPC combinando técnicas de membrana e cromatografia. MF: microfiltração; UF: ultrafiltração; OR: osmose reversa; MWCO: limite de exclusão molecular. (Ghosh et al., 1996).

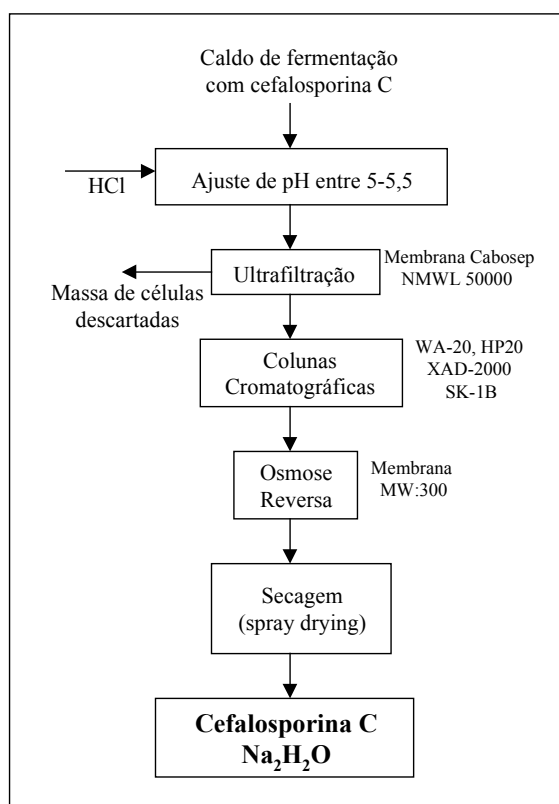


Figura 2.14: Fluxograma do processo de purificação de CPC (Ghosh et al., 1996).

A investigação do processo de adsorção de soluções diluídas de insulina na resina de troca iônica Accel Plus®QMA foi realizada por Cruz e Santana (1996). Os autores obtiveram dados experimentais de isoterma de equilíbrio, cinética de adsorção e efetuaram uma análise de transferência de massa envolvida no processo. O comportamento da isoterma seguiu o ajuste do tipo Langmuir (Equação 1). A capacidade de adsorção da resina, dentro das condições estudadas, foi de 300 mg de proteína por grama de resina. Curvas de ruptura em leitos fixos e fluidificados foram obtidas bem como a lavagem e eluição do leito que permitiram concentrar soluções de insulina com um fator de 50 vezes a concentração inicial e com rendimento de 80% na recuperação da proteína.

Oliveira et al. (1996) utilizaram basicamente cromatografia de troca iônica para separar e purificar a enzima beta-glicosidase a partir de um complexo enzimático. A resolução da troca iônica é determinada mais pela estratégia de eluição e menos pelo comprimento da coluna, sendo necessário o conhecimento das forças iônicas envolvidas e do pH da proteína desejada e dos contaminantes. Os ensaios foram realizados em batelada em coluna recheada com resinas apropriadas e esses parâmetros serviram para os autores como dados preliminares para esquematizar o processo contínuo de adsorção em tanque agitado. Com base nos resultados obtidos os autores concluíram que a beta-glicosidase pode ser purificada utilizando-se a resina catiônica CM-Sephadex C-50 como suporte para a fase de adsorção. Quanto ao eluente foi utilizado tampão citrato-fosfato 0,005M, pH 4,5.

Bautista et al. (1999) desenvolveram um estudo sobre o equilíbrio de adsorção da α -amylase obtida a partir de *Aspergillus oryzae* em duas resinas poliméricas comerciais, uma resina hidrofóbica (Duolite 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 -amylase 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.

Kalil et al. (2000) estudaram a purificação da enzima inulinase, útil na produção de xaropes com alto teor de frutose, em coluna de leito fixo com a resina de troca iônica Streamline SP. Pela análise dos resultados verificou-se que as melhores condições de operação no leito fixo foram: a utilização de uma velocidade linear de eluição de 100 cm/h, utilização de um gradiente linear salino (0-1M) e pH 4,1. Obteve-se nessas condições uma recuperação de 67,5% da enzima e um fator de purificação de 6,6. Os autores ainda estudaram a eluição tipo degrau e assim obtiveram uma recuperação semelhante de 66,9% e um fator de purificação um pouco menor (4,3) do que o obtido na eluição por gradiente.

Barboza et al. (2000) fizeram o estudo da purificação da cefalosporina C, proveniente de caldo fermentativo, em coluna de leito fixo utilizando a resina não iônica Amberlite XAD-2. O esquema do processo está mostrado na Figura 2.15. O processo de adsorção pôde ser avaliado em termos de fator de purificação e fator de concentração. A diminuição da temperatura de 25 para 10°C a um pH de 3,6 favoreceu o processo de adsorção. Assim nas melhores condições de operação da coluna de leito fixo, temperatura de 10°C e pH 3,6, os autores obtiveram um fator de concentração de cefalosporina C de 7,6 e um fator de purificação de 4,7, considerados bons valores na purificação de antibióticos.

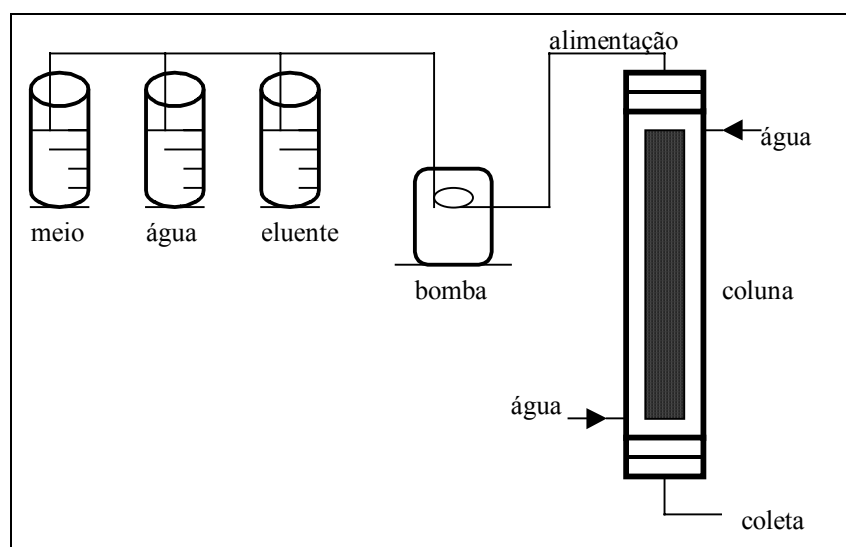


Figura 2.15: Esquema do processo de adsorção de cefalosporina C em leito fixo Barboza et al. (2000).

Em geral, para execução do aumento de escala do processo de adsorção, torna-se necessário o desenvolvimento de um modelo matemático que descreva adequadamente os diferentes mecanismos de transferência envolvidos no processo. Os experimentos em pequena escala para estimativa de parâmetros que constituem o modelo também são necessários. Barreto Jr. et al. (2001) apresentaram um modelo representativo da operação dinâmica do processo de adsorção da fenilalanina em resina catiônica em coluna de leito fixo. A fenilalanina é um dos aminoácidos constituintes do extrato de feijão e apresenta comportamento químico análogo ao da dihidroxi fenilalanina, fármaco utilizado no combate ao mal de *Parkinson*. O modelo apresentou-se como uma boa ferramenta para a predição do comportamento de colunas de adsorção. A técnica de discretização revelou-se robusta uma vez que o perfil de concentração de fenilalanina simulado na saída da coluna não apresentou oscilações, para as condições operacionais praticadas.

Para entender os mecanismos que envolvem a adsorção de água frente ao álcool por um adsorvente amiláceo, Carmo et al. (2001) desenvolveram um trabalho para obtenção de dados termodinâmicos e cinéticos fundamentais na separação álcool-água sobre amido. Os dados termodinâmicos mostraram a afinidade do amido pela água na presença de álcool e a capacidade de adsorção aumentou à medida que a polaridade do álcool diminuiu. Os autores concluíram ainda que a capacidade máxima de adsorção diminuiu com o aumento da temperatura e que a entalpia de adsorção aumentou com o aumento da cadeia molecular do álcool. As difusividades efetivas estimadas pelo modelo para várias temperaturas mostraram que a temperatura e o tamanho molecular dos álcoois possuem uma grande influência no processo cinético, devido ao aumento no grau de agitação molecular bem como um decréscimo na polaridade do álcool.

A cromatografia de afinidade é a técnica mais seletiva para purificação de proteínas. Ligantes bioespecíficos tais como anticorpos, os quais apresentam alta especificidade, têm sido imobilizados em vários suportes para purificação de imunoglobulinas do soro humano e animal. Aquino et al. (2002) estudaram a adsorção de imunoglobulina G (IgG) humana em um suporte sintético contendo histidina imobilizada como ligante de afinidade. Os autores descreveram as isotermas de equilíbrio desse sistema utilizando o suporte gel não derivatizado e derivatizado com o ligante histidina. Os dados foram analisados utilizando três modelos de isotermas, Langmuir, Freundlich e Langmuir-Freundlich. Os autores observaram que as moléculas de

IgG são adsorvidas no gel por interações não-específicas e que os dados experimentais foram melhor representados pelo modelo de Langmuir-Freudlich.

Gonçalves et al. (2002) estudaram a adsorção de Albumina do soro bovino (BSA) e Lisozima em HAp, avaliando as características das proteínas, a natureza dos sítios ativos da superfície do adsorvente e a influência do pH do meio. O fenômeno de adsorção de proteínas em hidroxiapatita (HAp) é um sistema bastante complexo devido às diferentes forças de interação presentes nas interfaces, associadas ao tamanho da biomolécula, as mudanças de conformação de acordo com o meio e os sítios ativos da superfície. Além disso, a HAp é um material que possui três diferentes tipos de adsorção; sítio cálcio Ca^{++} , sítio fosfato PO_4^{-3} e a hidroxila OH^- , que tem sua natureza alterada pelo pH do meio. O interesse no estudo deste adsorvente é devido à sua natureza biocompatível e sua representatividade como o maior constituinte inorgânico dos dentes e ossos, além disso, apresenta alta seletividade para separação de biomoléculas. Esses autores concluíram que o processo de adsorção parece ser governado pelas interações eletrostáticas, e pelas mudanças conformacionais da biomolécula. A BSA, proteína ácida e flexível evidenciou-se uma adsorção preferencial nos sítios Ca^{++} , mas podendo adsorver nos sítios PO_4^{-3} se estiverem disponíveis. A Lisozima, proteína básica e rígida adsorve preferencialmente nos sítios PO_4^{-3} , em menores quantidades que a BSA devido à rigidez da molécula e ao menor número desses sítios disponíveis.

A hidrólise enzimática de sacarose pela enzima invertase, produzindo glicose e frutose, constitui um exemplo de processo industrial de obtenção de açúcares de alto valor comercial. A separação destes açúcares, com a obtenção de produtos de alto grau de pureza, bem como novas concepções de reatores enzimáticos, com simultânea separação de produtos são campos a serem explorados nesta área. Para tal é necessário a seleção de adsorventes adequados que possibilitem boa capacidade de adsorção e seletividade para diferentes açúcares, bem como a determinação de parâmetros cinéticos e de equilíbrio. Burkert e Maugeri (2002) desenvolveram um trabalho para obtenção das isotermas de adsorção em banho finito de frutose e glicose em zeólita comercial verificando o efeito do cátion de compensação nesse processo. Esses autores estudaram também a separação destes açúcares em coluna de leito fixo, verificando o desempenho de separação com zeólita quando comparado com resina de troca iônica. As conclusões deste trabalho foram que a zeólita modificada com íons Ba^{2+} demonstrou maior eficiência quanto à capacidade de adsorção da frutose, apresentando baixo valor

adsorvido de glicose. Esta zeólita apresentou um desempenho superior na separação de frutose e glicose quando comparado com o uso de resina de troca iônica, sendo o mecanismo de separação favorecido pelo aumento de temperatura e para menores concentrações de açúcares. Os resultados obtidos permitiram afirmar que a zeólita na forma Ba^{2+} pode ser usada satisfatoriamente no processo de separação estudado.

Pelos trabalhos aqui apresentados pode-se observar a diversidade de produtos que se pode separar utilizando o processo de adsorção: antibióticos, enzimas, proteínas, e também a grande diversidade de adsorventes. Nota-se que este é um processo bastante versátil, porém necessita de muitos dados experimentais para se desenvolver um processo adequado e eficiente.

2.5.2 RECUPERAÇÃO DE PRODUTOS BIOTECNOLÓGICOS POR ADSORÇÃO CONTÍNUA

O processo de adsorção operado na forma contínua é menos comum que o processo em batelada, no entanto já se tem vários trabalhos que utilizaram este tipo de processo na recuperação de produtos biotecnológicos.

Um sistema contínuo de purificação de proteína foi desenvolvido por Pungor et al. (1987) usando como teste a adsorção da enzima beta-galactosidase, produzida por *E. coli.*, em PABTG-agarose, contendo impurezas artificiais. O sistema era constituído de dois reatores CSTR interligados por reciclo. O primeiro recebe continuamente o material a ser purificado ocorrendo o processo de adsorção enquanto o segundo reator é alimentado com eluente ocorrendo a dessorção do material. Os autores observaram uma recuperação da enzima de até 90% com um fator de purificação de 35. Também foi observado que, para se obter altas recuperações, a concentração de gel deve ser mais alta aumentando o custo do processo. Segundo Gordon et al. (1990), o processo contínuo de adsorção apresenta a possibilidade de purificar, concentrar e clarificar o material proveniente da fermentação, mantendo-se um alto rendimento de recuperação e eliminando etapas de pré-purificação.

Rodrigues et al. (1992) apresentaram o modelo matemático dinâmico para o processo contínuo de adsorção de proteínas na fase sólida de um suporte adsorvente. Esse processo, assim como o desenvolvido neste trabalho, é constituído de dois reatores perfeitamente agitados com reciclo de material sólido. O desempenho desse sistema é determinado pela natureza do adsorvente e do material alimentado a ser separado, pelas

vazões de alimentação, volumes dos reatores, e as constantes cinéticas dos estágios de adsorção e dessorção. O modelo proposto despreza qualquer efeito térmico associado à adsorção e dessorção e a operação do sistema deve ser então realizada em condições isotérmicas. Apesar de ser um modelo dinâmico pode ser facilmente analisado no estado estacionário colocando-se os termos de acumulação iguais a zero. O estudo de caso dos autores foi a adsorção de lysozima em gel de Sepharose. Com base nos resultados obtidos das simulações os autores verificaram que o modelo proposto descreve bem o comportamento do sistema e fornece importantes informações sobre o processo que só poderiam ser obtidas mediante um extenso trabalho experimental. o modelo foi considerado matematicamente simples e pode ser estendido para outros sistemas multi-componentes.

Barboza et al. (2002a) realizaram um estudo do processo contínuo para purificação de cefalosporina C utilizando um sistema composto por dois reatores de mistura com reciclo de resina. Um modelo matemático foi proposto e os dados para adsorção e dessorção de CPC previstos pelo modelo foram comparados com os dados experimentais. O modelo proposto por estes autores incorporou os termos de transporte de massa no modelo inicialmente proposto por Rodrigues et al. (1992). Os dados previstos pelo modelo ajustaram-se bem aos experimentais tanto para o processo utilizando CPC comercial quanto para o processo utilizando amostras de CPC provenientes de fermentação. O modelo pôde prever o comportamento geral do sistema e pode ser usado como uma ferramenta para otimização do processo.

O processo contínuo pode ser utilizado para vários produtos. Neste item foram descritos os vários trabalhos de purificação e separação de alguns produtos biotecnológicos pelo processo de adsorção. Porém, é importante citar os trabalhos de purificação que se referem exclusivamente ao ácido clavulânico e as várias técnicas utilizadas na separação desse produto.

2.6 PURIFICAÇÃO DE ÁCIDO CLAVULÂNICO

Vários autores e patentes descrevem processos de recuperação e purificação do ácido clavulânico, alguns dos quais são citados neste item.

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

de extração por solvente, a solução filtrada deve ser resfriada e o pH abaixado até a região de 2-3, pela adição de ácido, enquanto esta solução é misturada com um solvente orgânico como acetato de n-butila ou n-butanol ou acetato de etila. Depois da separação de fases por centrifugação o AC é extraído de volta para uma solução aquosa de tampão fosfato ou bicarbonato de sódio e o pH fica em torno de 7,0. Esse extrato aquoso pode ser concentrado com pressão reduzida gerando um sal de AC. Esse sal é estável quando armazenado como um sólido seco a -20°C . Quando se utiliza o processo com resina de troca iônica, o filtrado, em pH neutro 6-7, percola por uma coluna com uma resina tipo Amberlite IR4B ou Zerolite FFIF até a saturação da coluna que depois deve ser lavada com água e eluída com cloreto de sódio.

Já a patente US4367175 (Fleming et al., 1983) propôs a purificação de ácido clavulânico pela conversão deste em clavulanato de lítio com subsequente precipitação, normalmente na forma cristalina. Essa precipitação pode ser bem efetiva possivelmente devido à alta afinidade dos íons clavulanato pelos íons de lítio com pequena ou não significativa precipitação de outras impurezas, especialmente outros compostos beta-lactâmicos. Essa conversão de AC em sal de lítio pode ser realizada utilizando uma resina de troca iônica, Amberlite IRA68 ou Amberlite IRA93, utilizando-se como eluente cloreto de lítio. Porém muitas impurezas podem ser também adsorvidas pela resina. Para precipitar o clavulanato de lítio pode-se utilizar um solvente orgânico como acetona, metanol, etanol etc. A purificação de AC é sempre complexa particularmente devido à presença de compostos com propriedades e comportamentos similares ao do ácido clavulânico.

Butterworth (1984) descreveu o processo de recuperação e purificação do ácido clavulânico a partir de caldos de fermentação. Após a fermentação o caldo é clarificado por filtração e centrifugação. A extração primária do caldo clarificado pode ser realizada por diferentes métodos de separação. Na Figura 2.16 são descritos dois desses processos de separação.

No primeiro método o caldo fermentativo tem seu pH reduzido e a extração do AC é realizada utilizando-se um solvente orgânico, onde ocorre a separação das fases. A fase orgânica, que contém o AC, é misturada com uma solução de NaOH em pH 7,0. Finalmente o extrato é passado em uma coluna de leito fixo recheada com resina Amberlite XAD-4 para desmineralizar o meio, sendo então obtido o clavulanato de sódio. O segundo método mostra a adsorção em uma resina aniônica fortemente básica e eluição da coluna com solução aquosa de um sal, seguindo-se etapas de adsorção em

resinas XAD-4 e Zerolite SRA 62. O meio é finalmente desmineralizado em resina XAD-4. O produto final com alta pureza é obtido por liofilização ou por cristalização da solução aquosa.

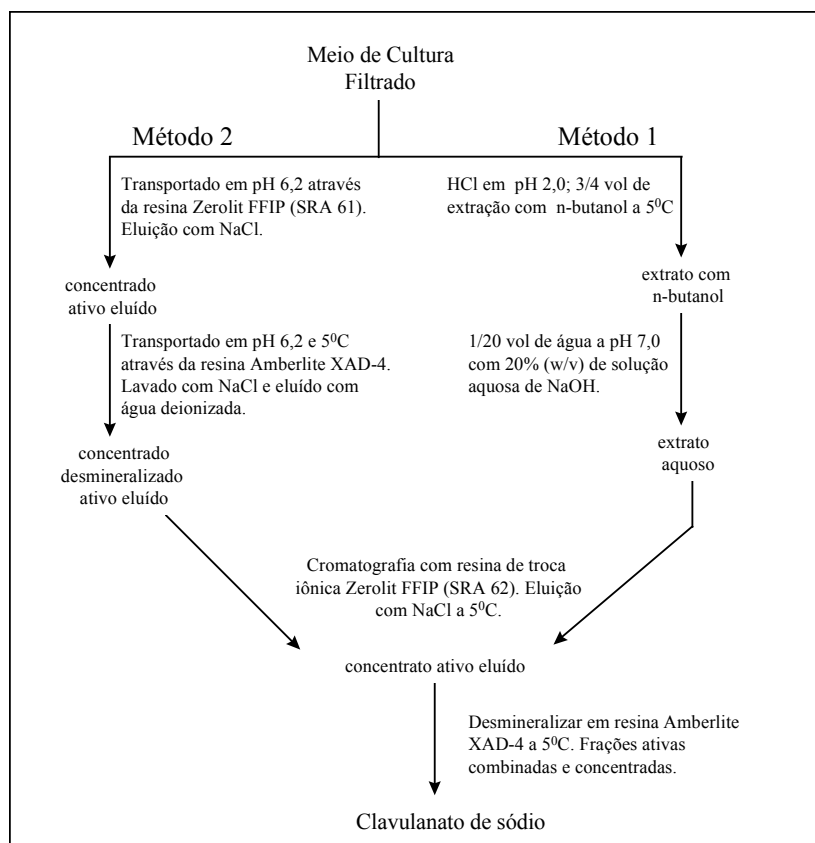


Figura 2.16: Esquema da recuperação e purificação do ácido clavulânico com dois métodos alternativos para extração primária (Butterworth, 1984).

Segundo O'Sullivan e Sykes (1986) o isolamento primário do ácido clavulânico pode ser feito tanto por separação líquido-líquido como por adsorção. Os autores mencionam alguns trabalhos de recuperação do AC tais como a adsorção em carvão ativado seguida da eluição com acetona 90% (Cook et al., 1981, apud O'Sullivan e Sykes, 1986); em resina Diaion PA 306 (Patente Japonesa, 1979, apud O'Sullivan e Sykes, 1986); ou ainda em Zerolite SRA61, seguida de eluição com cloreto de sódio e subsequente dessalinização em amberlite XAD-4 ou resinas Hokeutsu HS (Box, 1980, apud O'Sullivan e Sykes, 1986); processo de extração a pH 2 usando butanol como solvente (Cole et al., 1978).

Após esses métodos de extração primária o clavulanato bruto é purificado por cromatografia do composto ou de seu benzil éster ou ainda por cristalização. O benzil éster pode ser formado pela reação do clavulanato de sódio bruto com brometo de benzila em dimetilformamida à temperatura ambiente por cerca de quatro horas. Para se conseguir o clavulanato de benzila purificado deve-se proceder uma cromatografia utilizando a resina Sephadex LH20 com ciclohexano e clorofórmio como solvente na proporção de 1:1 v/v, seguida da cromatografia em sílica gel usando por sua vez ciclohexano e acetato de etila na proporção de 1:1 v/v. O clavulanato de benzila pode ser convertido em clavulanato de sódio tetrahidratado através da reação de hidrogenólise do éster utilizando paládio 10% suportado em carvão na presença da solução de bicarbonato de sódio e etanol e sua recuperação é feita por cristalização. Um método alternativo envolve o isolamento do clavulanato de lítio, através desse método o pH do caldo fermentativo é ajustado para 5,4, o caldo é filtrado e a seguir passado através de uma coluna de carvão vegetal. A eluição dessa coluna é feita com acetona em solução aquosa e o produto concentrado é passado por uma coluna com uma resina de troca iônica IRA 68; o eluente utilizado nesse caso é o cloreto de lítio (5% p/v), produzindo assim o clavulanato de lítio (O'Sullivan e Sykes, 1986).

Videira e Aires-Barros (1994) desenvolveram um sistema aquoso contendo duas fases, uma de polietileno glicol (PEG) e outra de fosfato de potássio para um processo alternativo de extração e purificação de ácido clavulânico. Os autores investigaram parâmetros relevantes no comportamento do processo tais como pH, massa molecular do polímero e as concentrações de polímero e de sal. Foi observado que o clavulanato de potássio tem alta afinidade com a fase rica em PEG com coeficiente de partição variando entre 1,5 a 114. O coeficiente de partição do clavulanato é independente da massa molecular do PEG na faixa de 1000 a 4000, mas aumenta com o aumento desta para 6000. O aumento do pH de 7,0 para 8,0 aumenta o coeficiente de partição do antibiótico na fase PEG recuperando cerca de 99% do clavulanato de potássio. Porém é importante salientar que a degradação de AC é maior em pH 8,0. Hirata (2003) também estudou o processo de separação de AC por extração em duas fases aquosas (PEG – fosfato de potássio). Foi observado que com esse sistema foi possível obter coeficiente de partição muito superior a unidade, altos valores de recuperação de AC, para alguns sistemas de até 94%, e concentrou a solução inicial de AC, com um fator de concentração de 2,13.

Um sistema de ultrafiltração com diafiltração em membrana FP-10 foi desenvolvido por Nabais e Cardoso (1995) para recuperação do ácido clavulânico através da separação sólido-líquido e da retenção de proteínas solúveis. Os autores constataram que o processo convencional de isolamento do AC a partir de caldos fermentados incluía os seguintes passos: tratamento do caldo com adição de floculantes; separação sólido-líquido com filtros rotativos à vácuo onde, devido a natureza do microrganismo utilizado na produção, era necessária a adição de um auxiliar de filtração; extração do antibiótico com solvente seguido dos processos de purificação, concentração e cristalização. Os autores compararam a extração do ácido clavulânico com n-butanol e pH 2,0 proveniente de dois processos: do caldo filtrado com adição do auxiliar de filtração e do caldo ultrafiltrado. Foi observado que a extração global do antibiótico usando ultrafiltração e filtração são similares. Porém a ultrafiltração traz diversos benefícios aos processos tais como separação de fases mais fácil, redução das perdas de solvente e geração de efluentes de extração mais limpos. A ultrafiltração traz a desvantagem de aumentar a diluição do produto devido à diafiltração, recomendando-se uma concentração deste por osmose reversa antes da etapa de extração por solvente. É importante comentar que o processo de extração de AC com solvente orgânico é sempre problemático quanto à degradação devido ao baixo pH utilizado. Deve-se ressaltar que a utilização de solventes orgânicos tem o problema de geração de resíduos tóxicos e de difícil tratamento e descarte.

Uma investigação do uso de resina Amberlite da série XAD para purificação do ácido clavulânico a partir de caldo de fermentação foi realizada por Mayer et al. (1996). Alguns estudos preliminares mostraram uma fraca interação entre o ácido clavulânico e a superfície apolar dessas resinas, como consequência da estrutura química do antibiótico. Um novo sistema com base na formação de um par iônico foi desenvolvido. Nesse sistema as resinas XAD foram testadas em combinação com sais de amônio quaternário possuindo diferentes polaridades e formando pares iônicos com o grupo ácido da molécula de AC. Para se comparar o desempenho desse sistema foram feitos testes com uma tradicional resina de troca iônica, a Amberlite IRA 400. Os autores constataram que o uso da cromatografia com formação de par iônico é uma alternativa viável e eficiente na purificação de AC. A resina Amberlite XAD4 com sais de amônio quaternário apresentou melhor desempenho que a IRA 400. Este artigo é um dos poucos que apresentam resultados tais como rendimento, e fatores de concentração e purificação. Os autores chegaram a um fator de concentração de 2,0 e fator de

purificação de 1,64 e os rendimentos não passaram de 65% para adsorção de AC proveniente de fermentação na resina IRA 400 em leito fixo.

Mayer et al. (1997) estudaram o processo de adsorção de ácido clavulânico através de experimentos em batelada em diferentes condições e em cada caso foi calculado o coeficiente de difusão efetivo com base em um modelo levando em conta a difusão intraparticular em esfera homogênea. Os resultados obtidos foram utilizados para comparar o desempenho do sistema de par iônico XAD4-ABDA (resina - sal de amônio quaternário), de carvão ativado e de troca iônica com a resina IRA 400. Foi observado que o sistema com carvão ativado é o menos vantajoso devido a sua estrutura microporosa que impede a passagem do AC. As matrizes poliméricas macroreticulares XAD4 e IRA 400 exibem melhores propriedades estruturais permitindo uma rápida adsorção. O sistema de par iônico com a resina XAD4-ABDA mostra algumas vantagens em relação ao sistema de troca iônica, pois é um sistema com sensibilidade relativamente baixa à variação das condições operacionais. Sua difusividade é menos influenciada pela temperatura e a presença de componentes competitivos no meio é menos prejudicial à cinética de adsorção, significando que o sistema é mais seletivo para o ácido clavulânico.

Alves et al. (2002) estabeleceram um procedimento para isolamento de ácido clavulânico de caldos fermentativos industriais utilizando a tecnologia de membranas. O isolamento de antibióticos a partir de caldos fermentativos utilizando membranas geralmente envolve de uma a três operações em seqüência; sendo a primeira para separação sólido-líquido podendo-se usar microfiltração ou ultrafiltração, em alguns casos uma segunda ultrafiltração é necessária para purificação do permeado da primeira etapa, finalmente pode-se utilizar uma nanofiltração para concentração do produto antes da extração por solvente. Os autores concluíram que no processo de recuperação de AC proposto as membranas com altos MWCO (150 kDa) proporcionaram altas vazões de permeação, porém deram origem a permeados de difícil separação na operação por extração com solvente devido à presença de proteínas. Para solução desse problema foram utilizadas membranas com 20 e 15 kDa apresentando melhores resultados na extração por solvente. O isolamento de AC utilizando esta tecnologia não necessitou de uma etapa de purificação intermediária, porém necessitou de uma etapa de concentração por nanofiltração antes da etapa de extração com solvente apropriado.

O site da empresa Rohm & Haas (www.rohmhaas.com) menciona uma resina de troca aniônica para recuperação de ácido clavulânico citando como referência a patente

US4110165 de 1978. A resina é a Amberlite FPA40 Cl usada para descolorização de soluções de xaropes de sacarose, tem uma matriz do tipo gel com alta porosidade. Pode também ser utilizada para descolorização de soluções orgânicas aquosas proveniente de caldos de fermentação e para fixação de enzimas.

Diferentemente do que ocorre com a cefalosporina C não se tem certo para o ácido clavulânico que processo utilizar para a sua purificação. Aparentemente inicia-se com filtração e termina-se com adsorção, mas os processos intermediários ainda não são um consenso. Através dos trabalhos e patentes aqui apresentados, verifica-se que existe uma tendência para utilização de processos de adsorção para purificação final do ácido clavulânico. O sistema mais comumente utilizado na indústria é adsorção em leito fixo em batelada, porém as indústrias atualmente estão bastante interessadas em processos contínuos que permitam maiores rendimentos tanto na produção quanto na parte de separação. Em busca de melhores eficiências para a purificação de ácido clavulânico, um processo não convencional de purificação (processo contínuo), que utiliza o princípio de separação da adsorção, pode torna-se uma alternativa importante para melhoria do processo de purificação. Além disso o AC é um composto bastante instável, com altas velocidades de degradação principalmente em pHs diferentes de 6,0. Assim, o processo por extração com solvente (pH 2,0) é um tanto prejudicial para o antibiótico, devendo-se utilizar baixas temperaturas e tempos pequenos de separação para minimizar os efeitos de hidrólise do pH no AC. Devido a essa alta taxa de degradação do AC faz-se necessário um estudo para investigar a cinética de hidrólise desse composto.

2.7 HIDRÓLISE DE COMPOSTOS BETA-LACTÂMICOS

A hidrólise de qualquer composto é uma reação homogênea em solução, na qual a água participa como um dos reagentes. As reações hidrolíticas podem ser catalisadas por ácidos ou por bases e nessas catálises a molécula de água pode funcionar tanto como ácido, doando prótons, quanto como base, recebendo prótons. A decomposição de compostos beta-lactâmicos, devido ao ataque de moléculas de água ou de íons hidroxila ao grupo carbonila do anel beta-lactâmico, segue uma cinética de pseudoprimeira ordem obedecendo a Equação 6.

$$-\frac{dC}{dt} = k \cdot C \quad (6)$$

Kocnecy et al. (1973) estudaram a cinética da hidrólise da cefalosporina C em solução aquosa a 25°C variando o pH de 1 a 12,5 com a utilização de soluções tampões. Esses autores observaram que a molécula de cefalosporina possui três sítios susceptíveis ao ataque de íons de hidrogênio, de íons hidroxila ou da água como pode ser mostrado nos pontos 1, 2, e 3 da Figura 2.17. No caso do ácido clavulânico, esse composto possui apenas um sítio capaz de sofrer hidrólise: o grupo carbonila do anel beta-lactâmico (ponto 1 da Figura 2.18) (Bersanetti et al., 2000).

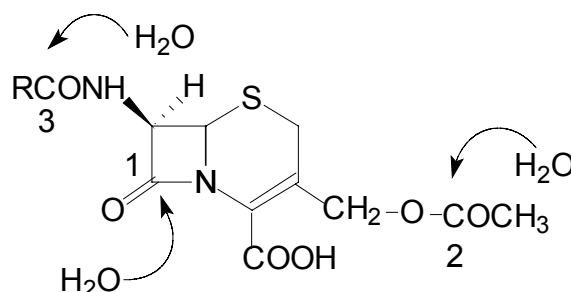


Figura 2.17: Pontos passíveis de hidrólise na molécula de cefalosporina.

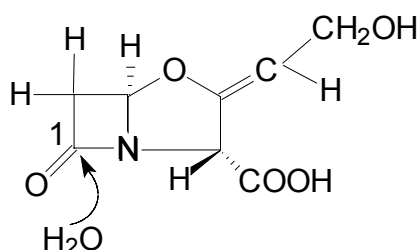


Figura 2.18: Ponto passível de hidrólise na molécula de AC.

Alguns autores investigaram a cinética de hidrólise do ácido clavulânico em solução tampão a vários pHs (Haginaka et al., 1981; Mayer e Deckwer, 1996; Bersanetti et al., 2000). Esses autores observaram que a degradação de AC também segue a cinética de pseudoprimeira ordem e é altamente susceptível à catálise devido a solução tampão utilizada para manter o pH constante. Haginaka et al. (1981) investigaram a estabilidade de AC a 35°C e força iônica (μ) de 0,5 a diferentes pHs e observaram que a constante de degradação desse antibiótico é altamente dependente do pH. A máxima estabilidade foi atingida em pH 6,39. Os autores também estudaram o efeito catalítico

da concentração de tampão com pH e força iônica constante e concluíram que a constante de degradação aumenta com o aumento da concentração da solução tampão utilizada.

Mayer e Deckwer (1996) estudaram a produção e decomposição simultânea de AC durante cultivos com *Streptomyces clavuligerus* em meio complexo contendo extrato de soja. A estabilidade de AC *in vitro* (na ausência de células) e *in vivo* foram investigadas. Os autores concluíram que as constantes de degradação para os ensaios *in vivo* eram de 2 a 10 vezes maiores que as obtidas nos ensaios *in vitro*. Enquanto que a hidrólise ácida pareceu ser a principal responsável pela instabilidade *in vitro* de AC, como indicado pela dependência da constante de degradação com o pH, alguns mecanismos adicionais estariam ativos na degradação *in vivo* de AC nos cultivos com meios contendo o extrato da farinha de soja.

Bersanetti et al. (2000) constataram que a máxima estabilidade de AC a temperatura de 20°C é em pH em torno de 6,0 e que a velocidade de degradação em soluções básicas, como mostrado na Tabela 2.3, é cerca de 40 vezes maior do que em meios ácidos (Tabela 2.3). Na Tabela 2.3 pode-se também comparar os valores das constantes parciais de hidrólise de ácido clavulânico com as da cefalosporina e observar que os valores de k_a e k_b para este último antibiótico é 250 e 6 vezes menores, respectivamente, do que os obtidos para AC. As constantes parciais estão relacionadas com a constante global de hidrólise pela Equação 7.

$$k = k_a [H^+] + k_n + k_b [OH^-] \quad (7)$$

Tabela 2.3: Valores das constantes parciais de hidrólise de AC e da cefalosporina em solução aquosa a 20°C.

Constante	Ác. Clavulânico (L.mol ⁻¹ .h ⁻¹)*	Cefalosporina (L.mol ⁻¹ .h ⁻¹)**
k_a	69,08	0,27
k_n	0,0057	0,0050
k_b	2928,21	500,00

*Dados obtidos por Bersanetti et al. (2000)

**Dados obtidos por Konecny et al. (1973)

Os autores mostraram ainda a relação entre a constante de hidrólise de ácido clavulânico em solução aquosa e a variação de pH de 2 a 10 (Figura 2.19). A curva em forma de U da Figura 2.19, representando a velocidade global de hidrólise de AC, é típica de reações susceptíveis à catálise ácido-base que obedecem a lei expressa pela Equação 7. Nesse trabalho também foi verificado que a variação da força iônica não tem influência na constante de hidrólise de AC dentro da faixa estudada pelos autores.

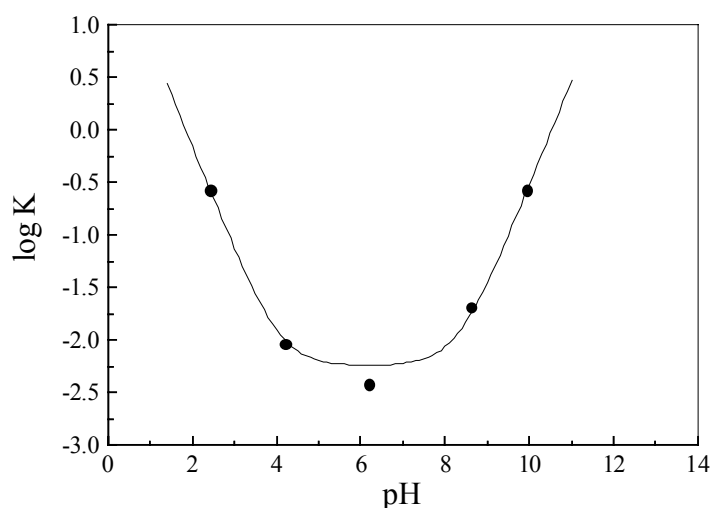


Figura 2.19: Variação da constante de degradação de AC com o pH a 20°C (Bersanetti et al., 2000).

Observando-se os aspectos abordados nessa revisão da literatura quanto à degradação de AC, pode-se concluir que com relação à cinética de hidrólise do ácido clavulânico, é necessário a realização de um estudo a várias temperaturas utilizadas no processo de adsorção, em pH em torno de 6,0, no meio de fermentação.

Com relação aos estudos dos processos de separação e purificação do AC, nenhum processo de adsorção alternativo foi investigado até o momento. Mesmo os estudos cinéticos de adsorção e dessorção em batelada não são totalmente conclusivos. A cinética de dessorção de AC com várias concentrações salinas não foi verificada na literatura, assim como um estudo a respeito das condições de operação tais como temperatura e pH. Portanto, este trabalho surgiu da necessidade de um conhecimento maior do processo de adsorção do AC, utilizando-se o processo contínuo como uma forma alternativa de purificação deste antibiótico. O desenvolvimento de um modelo matemático que descreva a adsorção de ácido clavulânico na resina utilizada também é

de grande importância para otimização do processo. Este trabalho teve também como finalidade verificar se o processo contínuo é um processo viável e compará-lo com o processo em leito fixo que é mais comumente utilizado na indústria.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MATERIAIS

3.1.1 MICRORGANISMO

O microrganismo utilizado para obtenção de ácido clavulânico foi a linhagem *Streptomyces clavuligerus* ATCC 27064. O microrganismo foi armazenado em criotubos a -70°C em ultrafreezer usando glicerol (10% v/v) como crioprotetor (Gouveia et al., 1999).

3.1.2 RESINAS

Resinas foram testadas, tanto de troca iônica quanto resinas ditas neutras ou hidrofóbicas, para o processo de adsorção de ácido clavulânico para que se pudesse escolher a melhor resina. A melhor resina foi aquela que apresentou maior relação em massa de antibiótico adsorvido por massa de resina, sem que ocorra degradação do antibiótico. Os testes para escolha da resina foram feitos através do estudo cinético do processo de adsorção e dessorção. As resinas testadas foram cedidas pela Rohm & Haas Quimica Ltda. ou adquiridas.

Resina de troca iônica:

–Amberlite IRA 400 (Rohm & Haas)

Resina hidrofóbica:

–Amberlite XAD-4 (Rohm & Haas)

3.2 EQUIPAMENTOS

Os principais equipamentos utilizados neste trabalho foram:

3.2.1 BIORREATORES

Para obtenção dos caldos de fermentação foi utilizado o biorreator tipo tanque agitado e aerado (Bioflo II e III) com 5 litros de volume útil, controle de temperatura e agitação.

3.2.2 REATORES DE MISTURA

Para realização de ensaios em batelada foram utilizados frascos de 150 mL com agitação mecânica e controle de temperatura. Esses tanques também foram utilizados no processo contínuo.

3.2.3 MESA INCUBADORA ROTATIVA

Mesa incubadora rotativa (“shaker”) da marca New Brunswick Scientific com controle de temperatura e agitação foi utilizada nos ensaios para determinação das isotermas de adsorção.

3.2.4 HPLC

A análise da concentração de ácido clavulânico foi realizada através do uso de cromatógrafo de fase líquida de alto desempenho (HPLC) ou com detector Waters 996 PDA e injetor 717 automático ou com bomba HP série 1050 e injetor Rheodyne 20 µL manual, coluna e pré-coluna C-18 µBondapack.

3.2.5 ESPECTROFOTÔMETRO

A análise da concentração de AC nos estudo de hidrólise em solução aquosa e a determinação da concentração de contaminantes no processo contínuo de adsorção

foram realizadas em espectrofotômetro digital UV/VIS Pharmacia Biotech Ultrospec 2100 pro.

3.2.6 BANHO TERMOSTATIZADO

Nos ensaios de hidrólise de AC em solução aquosa e em meio fermentado foram utilizados banhos termostatizados para manter a temperatura constante durante todos os ensaios. Nos ensaios de adsorção e dessorção em batelada e contínuo também utilizou-se banho termostatizado para manter a temperatura constante.

3.2.7 CENTRÍFUGA REFRIGERADA

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

3.2.8 MEDIDOR DE pH

Para medidas de pH das soluções, tampões e tratamento da resina foi utilizado um medidor de pH de bancada da marca ORION (modelo 710A) ou papel indicador universal pH 0-14 para medir rapidamente o pH durante os ensaios em tanque agitado com a resina Amberlite IRA 400 no ciclo hidroxila.

3.2.9 ULTRAFREEZER

A armazenagem e conservação do microrganismo em criotubos, do caldo de fermentação e das amostras dos ensaios de adsorção foram realizadas a uma temperatura de -70°C em ultrafreezer da marca Forma Scientific.

3.2.10 COMPUTADOR

Microcomputadores tipo PC foram utilizados para tratamento dos dados experimentais, modelagem e simulação dos dados do processo.

3.2.11 OUTROS EQUIPAMENTOS

Demais equipamentos utilizados em laboratórios químicos e bioquímicos tais como balanças, estufas, bombas peristálticas entre outros.

3.3 MÉTODOS

3.3.1 OBTENÇÃO DE SOLUÇÕES DE ÁCIDO CLAVULÂNICO

Nos estudos de adsorção e dessorção e da cinética de hidrólise o ácido clavulânico foi obtido de três diferentes fontes: mistura de SiO₂/clavulanato de potássio gentilmente cedida pela Gist Brocades (AC.1); clavulanato de potássio do produto farmacêutico Clavulin® (Suspensão oral 5 mL contém 62,5 mg de clavulanato de potássio e 250 mg de amoxicilina), produzido por SmithKline Beecham Laboratórios Ltda., Rio de Janeiro, Brasil (AC.2); e ácido clavulânico de caldo fermentativo (AC.3).

As fermentações para produção de AC.3 foram realizadas no laboratório de fermentações do DEQ-UFSCar utilizando-se uma temperatura de 28°C em biorreator tipo tanque agitado e aerado de 5 litros. O inóculo foi preparado em mesa rotativa em frasco de 500 mL com 50 mL de meio a 28°C e 250 rpm. O meio de cultura da fermentação foi composto por: glicerol (15g); extrato de malte (10g); hidrolizado de soja Samprosoy 90 NB (10g); MgSO₄·7H₂O (0,75g); K₂HPO₄ (0,80g); óleo de soja (1,0g); solução de sais (1,0mL); água destilada (1,0L), pH 6,8 com NaOH (Rosa et al. 2001).

3.3.2 TRATAMENTO DO MEIO FERMENTADO

Após a fermentação, o caldo foi centrifugado por cerca de 15 minutos a 11000 rpm e a 10°C para separação das células. O sobrenadante foi recolhido e acidificado com H₂SO₄ até pH 3,5 para precipitação dos sólidos em solução. O meio foi então novamente centrifugado, nas mesmas condições da primeira centrifugação, e o sobrenadante recolhido. O pH foi ajustado, para 6,2, para evitar uma maior degradação do antibiótico. Esse sobrenadante foi filtrado por membranas de 0,45 µm de tamanho de poro para retenção de outros componentes insolúveis presentes

no meio. Esta etapa de filtração também foi realizada a baixas temperaturas com auxílio de um banho de gelo para evitar a degradação do antibiótico. A solução resultante da filtração foi armazenada em pH 6,2 (Bersanetti et al., 2000) em ultrafreezer a -70°C .

3.3.3 ANÁLISE DA CONCENTRAÇÃO DE ÁCIDO CLAVULÂNICO

(A) HPLC

As concentrações de ácido clavulânico foram determinadas através de cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC) como proposto por Foulstone e Reading (1982) com reação com imidazol. Foi utilizada uma coluna C-18 μ -Bondapak (3,9 x 300 mm) e o equipamento foi operado dentro das seguintes condições: temperatura 28°C e fluxo 2,5 mL/min. Os resultados foram obtidos utilizando-se uma curva de calibração construída a partir do padrão de ácido clavulânico, soluções na forma de clavulanato de potássio obtidas do produto farmacêutico Clavulin® (Suspensão oral 5 mL contém 62,5 mg de clavulanato de potássio e 250 mg de amoxicilina), produzido por SmithKline Beecham Laboratórios Ltda., Rio de Janeiro, Brasil. A fase móvel era composta de KH_2PO_4 (0,1 M) e 6% de metanol em pH 3,2 com ácido fosfórico. A Figura 3.1 mostra o esquema de reação de ácido clavulânico com imidazol.

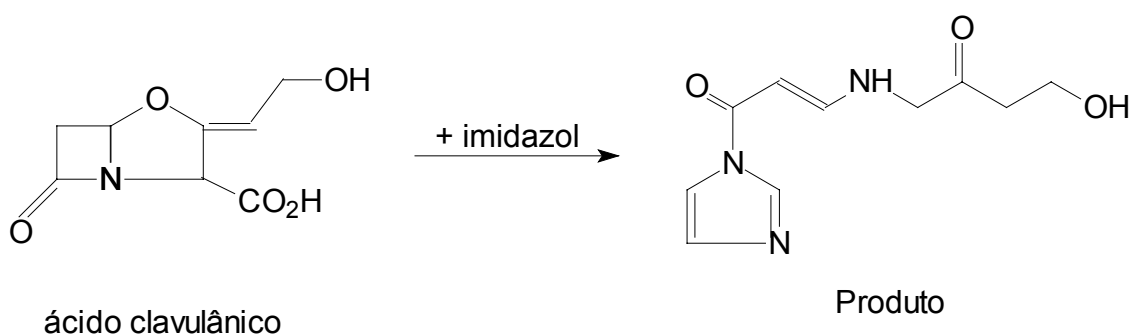


Figura 3.1: Esquema de reação de AC com imidazol (Eckers et al., 1996).

No procedimento de derivatização de AC, o imidazol ataca o grupo carbonil do anel beta-lactâmico quebrando a ligação C-N e formando uma nova ligação C-N entre o imidazol e o carbono do carbonil. A quebra do anel beta-lactâmico também leva a abertura do anel oxazolidina com conseqüente descarboxilação dando o produto

mostrado na Figura 3.1 (Eckers et al., 1996). O produto dessa reação é um produto mais estável que o AC e sua formação é diretamente proporcional à concentração de AC presente na reação. As Figuras 3.2 e 3.3 mostram cromatogramas obtidos na análise de uma amostra de padrão de 100 mg/L de ácido clavulânico pelo método descrito acima com reação e sem reação com imidazol, respectivamente. O cromatograma obtido sem reação com imidazol não tem definição e o cromatograma com reação tem o pico do antibiótico bem definido.

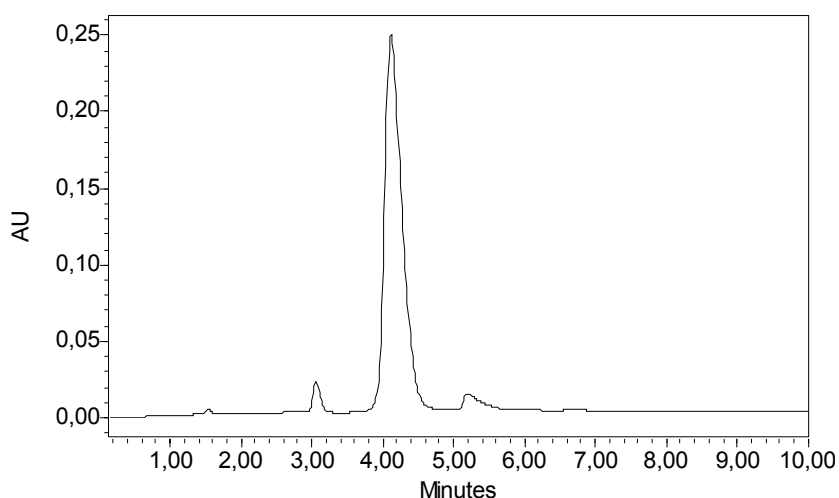


Figura 3.2: Cromatograma de AC obtido pelo método de Foulstone e Reading (1982) com reação com imidazol.

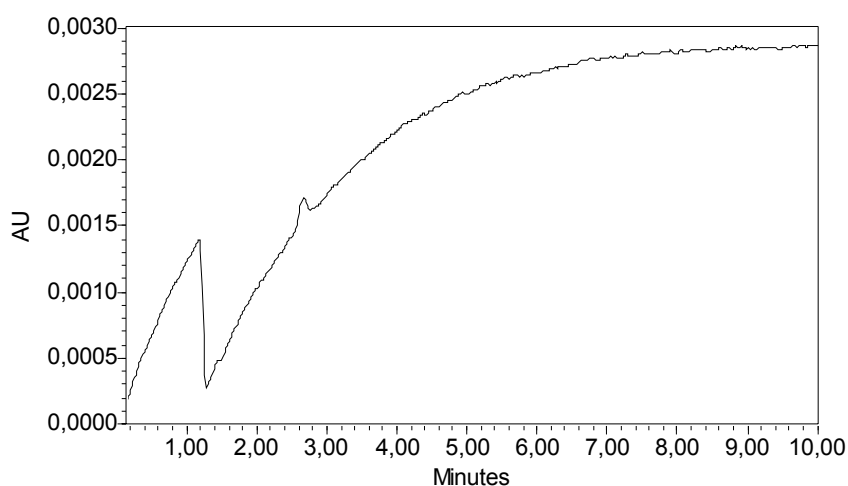


Figura 3.3: Cromatograma de AC obtido pelo método de Foulstone e Reading (1982) sem reação com imidazol. AU: absorbância

(B) Espectrofotometria

Nos estudos de hidrólise de AC em solução aquosa a quantificação deste antibiótico foi realizada através da reação com solução de imidazol 60 g/L e pH 6,8 segundo o método descrito por Bird et al. (1982). Essa reação produz um composto estável com intensa absorvância a 312nm. Método descrito por Bird et al. (1982) foi utilizado apenas para AC.1 e AC.2, pois para o AC proveniente de fermentação a determinação da concentração deste composto por HPLC é mais confiável. O esquema da Figura 3.4 mostra os passos realizados para quantificação de AC tanto em HPLC quanto no espectrofotômetro.

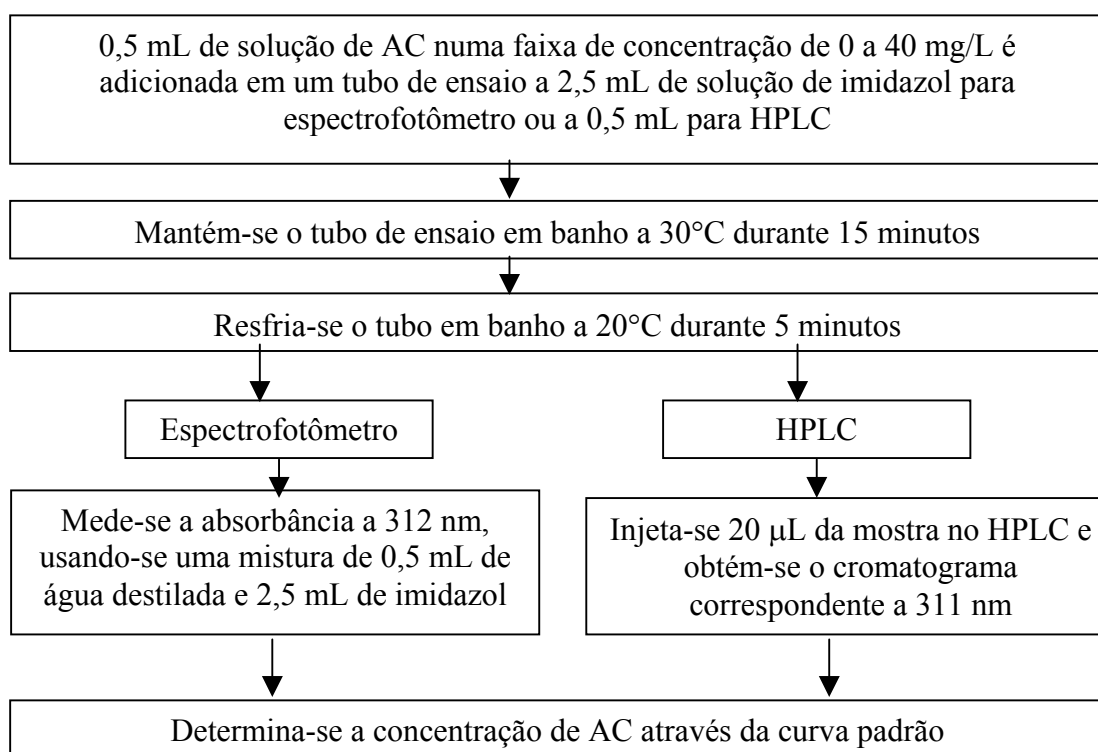


Figura 3.4: Esquema de quantificação de AC pelo método de reação com imidazol.

3.3.4 ANÁLISE DA CONCENTRAÇÃO DE CONTAMINANTES

A concentração de contaminantes nos ensaios experimentais do processo contínuo de adsorção do ácido clavulânico foi determinada pelo espectrofotômetro a 280 nm, descontando-se a concentração de ácido clavulânico nesse comprimento de onda. Para tal, fez-se inicialmente uma curva de calibração para o ácido clavulânico neste comprimento de onda ($Y_{AC} = 0,00226 + 0,00198 \cdot C_{AC}$). A concentração de AC (C_{AC}) medida no HPLC era colocada nesta equação, gerando um Y_{AC} correspondente. A concentração de contaminantes era então o resultado da leitura no espectrofotômetro menos o Y_{AC} .

4 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

4.1 ESTUDO DA HIDRÓLISE DO ÁCIDO CLAVULÂNICO EM SOLUÇÃO AQUOSA E EM MEIO FERMENTADO

Os estudos cinéticos de hidrólise de ácido clavulânico em solução aquosa e em meio fermentado foram realizados a pH 6,2 e 7,0. A temperatura de cada ensaio foi mantida constante através de banho termostatizado. Em frascos de 100 mL, foram adicionados 20 mL de solução de ácido clavulânico a uma concentração inicial de 100 mg/L, 30 mL de solução tampão fosfato 0,04 M e cloreto de potássio para ajustar a força iônica para 0,5. Em intervalos de tempo adequados foram retiradas alíquotas de 0,5 mL e a concentração de ácido clavulânico não degradado foi determinada pelo método de reação com imidazol por espectrofotômetro quando em solução aquosa e por HPLC em meio fermentado. As temperaturas e pHs utilizados nesse trabalho estão na Tabela 4.1. O procedimento e os pHs escolhidos foram baseados nos dados da literatura (Haginaka et al., 1981; Bersanetti et al., 2000) que concluíram que o ácido clavulânico é mais estável em pH 6,0. As temperaturas utilizadas nesse estudo foram temperaturas razoáveis que podem ser utilizadas no processo de recuperação de AC.

Tabela 4.1: Temperaturas e pHs utilizados no estudo da hidrólise de AC.

	pH	Temperatura
AC.1 e AC.2	6,2	10, 20, 25 e 30°C
AC.3	6,2	10, 20, 30 e 40°C
AC.1; AC.2 e AC.3	7,0	10, 20, 30 e 40°C

4.2 CINÉTICA DE ADSORÇÃO E DESSORÇÃO

Os estudos cinéticos de adsorção e dessorção foram realizados através de experimentos efetuados em tanque provido de agitação mecânica e controle de temperatura através de banho termostatizado. Foram retiradas alíquotas em intervalos de tempo definidos e a concentração de ácido clavulânico foi analisada em HPLC. A relação entre a massa de resina e o volume de solução contendo ácido clavulânico utilizada foi sempre igual a 50 g/L. Após a etapa de adsorção, foi realizada uma etapa de lavagem da resina com água milli-Q antes da eluição propriamente dita utilizando-se NaCl como eluente. A cinética de adsorção e dessorção foi realizada em diferentes temperaturas, pHs e concentrações de NaCl.

4.3 ISOTERMAS DE EQUILÍBRIO

Os ensaios de adsorção em batelada foram realizados para que se possa adquirir dados necessários para a determinação de isotermas de equilíbrio de ácido clavulânico nas respectivas resinas. As isotermas de AC na resina de troca iônica IRA 400 foram obtidas nas temperaturas de 5, 10, 23 e 30°C para AC.1 e 10, 20 e 30°C para AC.3.

Para cada volume definido de solução contendo antibiótico foi adicionada uma quantidade definida de adsorvente (5 mL de solução para 0,25 g de adsorvente massa úmida). Diferentes concentrações foram obtidas por diluição destas soluções em água milli-Q ou concentração da solução de AC proveniente de fermentação com ácido clavulânico puro. Os frascos com resina e antibiótico foram agitados a 200 rpm em câmaras com controle de temperatura. Após o equilíbrio ser atingido, aproximadamente 1 hora, os valores das concentrações finais foram analisados em HPLC obtendo-se as isotermas de equilíbrio. O tempo de equilíbrio foi definido com base no estudo da cinética de adsorção.

A concentração final de cada amostra foi denominada concentração de equilíbrio, C^* , esta concentração deve estar em equilíbrio com a fração de antibiótico adsorvida, q^* . O cálculo de q^* pode ser feito utilizando-se a Equação 8.

$$q^* = \frac{(C_0 - C^*) \cdot V_{\text{sol}}}{m_{\text{res}}} \quad (8)$$

onde:

q^* = fração de antibiótico adsorvida em equilíbrio

C_0 = concentração inicial

C^* = concentração de equilíbrio

V_{sol} = volume de solução

m_{res} = massa de resina

Assim, para cada concentração inicial da solução de ácido clavulânico tem-se C^* , concentração final de equilíbrio, e a quantidade de antibiótico adsorvido q^* . Após a obtenção da isoterma, a regressão não linear dos dados experimentais foi realizada verificando-se qual modelo de equilíbrio melhor representa o processo de adsorção.

Com base nesses estudos cinético e nas isotermas de equilíbrio foi realizada modelagem matemática do sistema de adsorção e dessorção tanto do processo em batelada como do processo contínuo. O modelo proposto foi o mesmo modelo descrito por Barboza (1998) para adsorção de cefalosporina C.

4.4 PROCESSO CONTÍNUO

O processo contínuo de adsorção do ácido clavulânico funcionou da seguinte forma: a solução contendo o produto foi alimentada continuamente no primeiro reator, onde ocorre a etapa de adsorção, pois o produto entra em contato com o adsorvente iônico e é por ele adsorvido. As partículas de adsorvente contendo o produto foram então transportadas para o segundo reator onde ocorre a etapa de dessorção pela adição do eluente (solução de NaCl). As partículas de adsorvente foram novamente recicladas para o primeiro tanque e o antibiótico eluído foi então removido do segundo tanque. Os dois reatores foram considerados perfeitamente agitados. O processo contínuo com suas variáveis está esquematizado na Figura 4.1. Onde:

sub-índice: 0: inicial;

1: 1º estágio;

2: 2º estágio;

C_i : concentração de AC;

C_{Ti} : concentração de contaminantes;

C_{Ei} : concentração de eluente;

- F_i : vazão de alimentação e retirada de solução;
- F_r : vazão de reciclo;
- q_i : fração adsorvida;
- k_1 : constante cinética de adsorção;
- k_2 : constante cinética de dessorção (1º estágio);
- k_3 : constante cinética de dessorção (2º estágio).

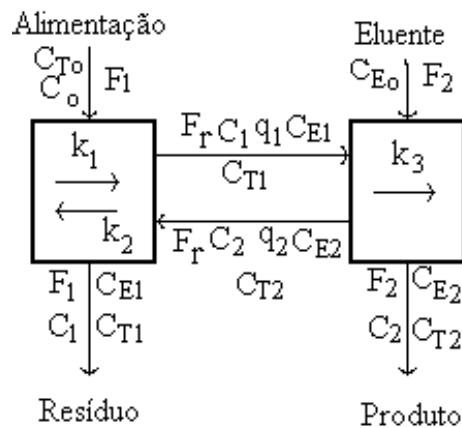


Figura 4.1: Esquema do processo contínuo de adsorção do ácido clavulânico (Barboza, 1998).

4.5 OTIMIZAÇÃO DE PARÂMETROS DO PROCESSO CONTÍNUO

A otimização dos parâmetros do processo contínuo de adsorção de AC utilizando-se a análise de superfície de resposta foi realizada. Esta análise é uma técnica de planejamento experimental com base no método de planejamento fatorial. Para esse propósito, foi necessária a determinação dos intervalos das variáveis independentes. Através dessa análise pôde-se verificar a influência das variáveis envolvidas no processo contínuo obtendo-se a faixa onde cada variável maximiza as respostas de rendimento (Y), fator de concentração (FC) e fator de purificação (FP). As seis variáveis independentes escolhidas para realizar a otimização foram fração de líquido em cada estágio (ϵ_{ri}), concentração inicial de AC (C_0), tempos de residência do reator (θ_{ri}) e o tempo de residência de sólidos (θ_{s1}).

4.5.1 OBTENÇÃO DOS INTERVALOS PARA AS VARIÁVEIS INDEPENDENTES

Para a obtenção dos níveis +1, -1 e zero, tomou-se como base os experimentos realizados no processo contínuo onde os valores para cada parâmetro são assumidos como sendo do nível zero. O nível +1 foi obtido acrescentando uma determinada porcentagem x para cada variável. Já o nível -1, diminuindo uma mesma porcentagem x . Na Tabela 4.2, são apresentados os níveis para cada variável independente.

Tabela 4.2: Valores de intervalos assumidos para cada variável independente do processo contínuo de adsorção de AC.

Variáveis	Níveis Utilizados		
	-1	0	+1
θ_{r1} (min.)	63,0	68,0	73,0
θ_{r2} (min.)	24,5	30,6	36,7
θ_{s1} (min.)	91,0	101,1	111,2
ε_{r1} (-)	0,77	0,86	0,95
ε_{r2} (-)	0,48	0,60	0,72
C_0 (g/L)	0,075	0,100	0,125

Os intervalos da Tabela 4.2 foram obtidos através da aplicação de porcentagens sobre o ponto central (nível zero). Para a variável C_0 , aplicou-se 25%. Já para θ_{r1} , ε_{r1} e θ_{s1} , aplicou-se 10%. E por fim, aplicou-se 20% na variável θ_{r2} e ε_{r2} . Os valores aplicados a cada variável foi tal que não permitisse que as vazões de entrada dos reatores F_1 e F_2 e a vazão de reciclo F_r fossem negativas. Para isso é necessário que: $\theta_{s1} > \theta_{r1}$; $\theta_{s2} > \theta_{r2}$.

Pelos valores da Tabela 4.2 verifica-se essas condições foram obedecidas e que um experimento pôde ser realizado a partir do intervalo conferido a cada variável independente, pois os valores de vazão são possíveis operacionalmente.

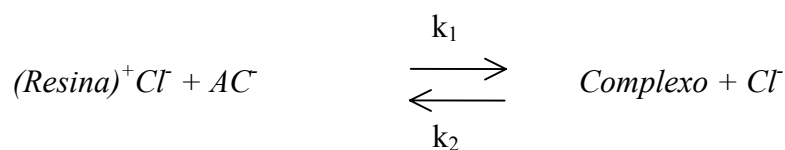
5 MODELAGEM MATEMÁTICA

Para estudar o processo de purificação de AC por adsorção proposto neste trabalho foi necessário conhecer o comportamento cinético das etapas de adsorção e dessorção de AC na resina estudada. Neste item apresenta-se a proposta de um modelo para cinética de adsorção e dessorção em batelada de ácido clavulânico na resina IRA 400-Cl (Barboza et al., 2002b). O modelo do presente trabalho foi similar ao proposto por Barboza (1998) para o estudo de adsorção da cefalosporina C sobre a resina Amberlite XAD-2. Similarmente ao processo em batelada, um modelo matemático para o processo contínuo de adsorção do AC também foi proposto (Almeida et al., 2003a). O modelo para o processo contínuo do presente trabalho também foi semelhante ao proposto por Barboza (1998) para esse processo para cefalosporina C

5.1 MODELO CINÉTICO

5.1.1 CINÉTICA DE ADSORÇÃO

Adsorção de ácido clavulânico na resina:



onde: Complexo = (Resina)Cl⁻AC⁻

A expressão que descreve o modelo cinético intrínseco está apresentada na Equação 9.

$$r_{q1} = k_1 C_i (q_m - q_i) - k_2 q_i \quad (9)$$

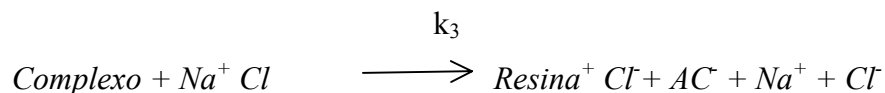
onde k_1 e k_2 são constantes cinéticas intrínsecas, C_i é a concentração do antibiótico em solução em qualquer posição dentro da resina, q_i é a concentração de antibiótico adsorvido em um sítio específico da resina e q_m é a máxima capacidade de adsorção da resina. No equilíbrio de adsorção o modelo utilizado é a isoterma de Langmuir (Equação 1 item 2.4.3):

$$q^* = \frac{q_m C^*}{K_D + C^*} \quad (1)$$

onde q^* é a fração adsorvida no equilíbrio (g_{AC}/g_{res}), C^* é a correspondente concentração de equilíbrio na fase líquida, q_m é a máxima capacidade de adsorção da resina e K_D é a constante de dissociação, igual a k_2/k_1 .

5.1.2 DESSORÇÃO DE AC NA RESINA

A dessorção ocorre quando o equilíbrio é deslocado pela mudança das condições do processo, nesse caso a concentração de sal (NaCl). Para descrever o processo de dessorção pode-se assumir similarmente à etapa de adsorção:



A expressão da cinética de dessorção está representada pela Equação 10, onde k_3 é a constante cinética intrínseca relacionada ao processo de dessorção.

$$r_{q2} = -k_3 q_i \quad (10)$$

5.2 MODELO MATEMÁTICO PARA ADSORÇÃO EM TANQUE AGITADO

O modelo matemático para adsorção em tanque agitado segue o procedimento apresentado por Barboza et al. (2002b). Considerando-se um reator perfeitamente agitado, um volume V_S do adsorvente está colocado em contato com um volume V_L de

solução de AC com concentração inicial C_0 . O soluto (AC) difunde nas partículas da resina e é adsorvido até o equilíbrio ser atingido. Na formulação do modelo assume-se que: as partículas de resina são esféricas; a difusão de AC nas partículas sólidas segue a lei de Fick; a difusão ocorre apenas na direção do raio da partícula; a adsorção ocorre à temperatura constante. Assume-se também que o AC adsorvido está em equilíbrio com aquele presente no fluido em cada posição radial dentro da partícula. As equações de conservação (Equação 11) e condição inicial (Equação 12) foram usadas para descrever a cinética de adsorção do AC nas partículas esféricas de raio R em um sistema fechado em batelada.

$$\frac{d C_{\text{bulk}}}{d t} = - \frac{3 V_S}{R V_L} k_S (C_{\text{bulk}} - C_S) \quad (11)$$

A condição inicial que satisfaz a Equação 11 é:

$$t=0 \rightarrow C_{\text{bulk}}=C_0 \quad (12)$$

O balanço de massa diferencial dentro das partículas sólidas, onde ocorre a adsorção na superfície porosa é:

$$\frac{\partial C_i}{\partial t} = D_{\text{ef}} \left(\frac{\partial^2 C_i}{\partial r^2} + \frac{2}{r} \frac{\partial C_i}{\partial r} \right) - \frac{(1-\varepsilon_p)}{\varepsilon_p} r q \quad (13)$$

Se o equilíbrio na superfície for considerado, a Equação 13 pode ser reduzida na Equação 14.

$$\left[\varepsilon_p + (1-\varepsilon_p) \frac{\partial q_i}{\partial C_i} \right] \frac{\partial C_i}{\partial t} = \varepsilon_p D_{\text{ef}} \left(\frac{\partial^2 C_i}{\partial r^2} + \frac{2}{r} \frac{\partial C_i}{\partial r} \right) \quad (14)$$

As condições iniciais (Equação 15) e de contorno (Equações 16 e 17) associadas à difusão no interior das partículas sólidas são:

$$t = 0 \rightarrow C_i = q_i = 0 \quad (15)$$

$$r = R \rightarrow \frac{\partial C_i}{\partial r} = \frac{k_s}{\varepsilon_p D_{ef}} (C_b - C_s) \quad (16)$$

$$r = 0 \rightarrow \frac{\partial C_i}{\partial r} = 0 \quad (17)$$

A equação de difusão no interior das partículas pode ser discretizada e resolvida pelo método de colocação ortogonal onde a condição de contorno referente à resistência pelicular é utilizada como um ponto de colocação (Villadsen e Michelsen, 1978). Para integrar as equações diferenciais utilizou-se o método DASSL (Petzold, 1989). O método de Nedler e Mead (1965) para otimização de parâmetros foi utilizado para determinar a difusividade efetiva (D_{ef}) e o coeficiente de película (k_s). A otimização pôde ser feita procurando-se diminuir a diferença da soma dos erros ao quadrado, ou seja, minimizando a função objetiva definida pela Equação 18:

$$\Phi = \sum_1^N (C_b - C_{exp})^2 \quad (18)$$

O valor de k_3 pode ser obtido seguindo o mesmo algoritmo. Os valores de concentração no tanque agitado, no interior da resina e a quantidade de AC adsorvido são utilizados como condições inicial e de contorno. O modelo cinético utilizado é o descrito pela equação 14. Nesse caso os valores de D_{ef} e k_s são considerados constantes e a variável estimada é o k_3 .

Quando os valores de Φ_i nos vértices do simplex e seus valores médios $\bar{\Phi}_i$ satisfazem a desigualdade da Equação 19 a otimização é finalizada.

$$\left(\frac{\sum_1^m (\Phi_i - \bar{\Phi}_i)^2}{m+1} \right)^{1/2} < e \quad (19)$$

onde m é o número de parâmetros a serem otimizados e e é o parâmetro de convergência, assumido como sendo 10^{-5} .

5.3 MODELAGEM MATEMÁTICA DO PROCESSO CONTÍNUO

O modelo matemático utilizado para a simulação do processo contínuo de adsorção de AC foi descrito inicialmente por Rodrigues et al. (1992), mas esses autores não consideraram os efeitos de transferência de massa. Barboza (1998), incorporou a difusividade a este modelo matemático. O modelo utilizado no presente trabalho foi descrito por Almeida et al. (2003a) para CPC. O processo contínuo com suas variáveis está esquematizado na Figura 4.1. Esse processo é composto por dois tanques agitados interligados através de reciclo de resina. No primeiro tanque ou primeiro estágio ocorre a adsorção com alimentação contínua de produto e retirada de resíduo. No segundo tanque ou estágio ocorre a dessorção e simultânea regeneração da resina com alimentação contínua de eluente (NaCl) e retirada de produto.

Na modelagem do processo contínuo, com o objetivo de reduzir o número de variáveis envolvidas, 4 variáveis globais foram definidas previamente pelas Equações 20 a 23. Os tempos de residência do reator para o 1° e 2° estágios definidos nas Equações 20 e 21, respectivamente, e as Equações 22 e 23 definem os tempos de residência dos sólidos também para o 1° e 2° estágios, respectivamente.

$$\theta_{r_1} = \frac{V_1}{F_1 + F_r \varepsilon_{r1}} \quad (20)$$

$$\theta_{r_2} = \frac{V_2}{F_2 + F_r \varepsilon_{r2}} \quad (21)$$

$$\theta_{s_1} = \frac{V_1}{F_r \varepsilon_{r1}} \quad (22)$$

$$\theta_{s_2} = \frac{V_2}{F_r \varepsilon_{r2}} \quad (23)$$

O tempo de residência do reator é a razão entre o volume total de líquido e a vazão global de alimentação. O tempo de residência de sólidos é a razão entre a quantidade de resina no reator e a vazão de retirada da resina do sistema. Os valores das vazões (F_1 , F_2 e F_r) foram calculados com base nos tempos de residência do reator e de

sólidos previamente estabelecidos para um dado volume de operação em cada um dos tanques agitados.

As equações diferenciais que descrevem o comportamento do sistema contínuo tanto para o primeiro quanto para o segundo estágio foram descritas abaixo. O efeito de degradação do AC não foi incorporado ao modelo matemático devido às condições de temperatura e pH empregadas no processo.

5.3.1 PRIMEIRO ESTÁGIO

(A) Balanço para AC:

Difusão intraparticular

$$\varepsilon_p \frac{\partial C_{il}}{\partial t} = D_{efl} \varepsilon_p \left(\frac{\partial^2 C_{il}}{\partial r^2} + \frac{2}{r} \frac{\partial C_{il}}{\partial r} \right) - (1 - \varepsilon_p) r q_{il} \quad (24)$$

$$r q_{il} = k_1 C_{il} (q_{m1} - q_{il}) - k_2 q_{il} \quad (25)$$

Condições iniciais e de contorno:

$$t = 0 \rightarrow q_{il} = C_{il} = 0 \quad (26)$$

$$r = 0 \rightarrow \frac{\partial C_{il}}{\partial r} = 0 \quad (27)$$

$$r = R \rightarrow \frac{\partial C_{il}}{\partial r} = \frac{k_{s1}}{\varepsilon_p D_{efl}} (C_1 - C_{s1}) \quad (28)$$

Fase líquida

$$\frac{dC_1}{dt} = \frac{(C_0 - C_1)(\theta_{s1} - \theta_{\eta})}{(\theta_{s1} \theta_{\eta})} + \frac{1}{\theta_{s1}} (C_2 - C_1) + [-k_1 \bar{C}_1 (q_{m1} - \bar{q}_1) + k_2 \bar{q}_1] \frac{(1 - \varepsilon_r)}{\varepsilon_r} \rho_{res} \quad (29)$$

Fase sólida

$$\frac{d\bar{q}_1}{dt} = \frac{1}{\theta s_1} (\bar{q}_2 - \bar{q}_1) - [-k_1 \bar{C}_1 (qm_1 - \bar{q}_1) + k_2 \bar{q}_1] \quad (30)$$

Aqui, \bar{q}_i e \bar{C}_1 são valores médios calculados pelos pesos da quadratura de Radau (Equações 31 e 32); - quando se tem contorno na superfície do sólido - ou quadratura Gaussiana, (Equação 33); - quando algum contorno não é considerado na superfície (Villadsen & Michelsen, 1978).

$$\bar{q}_1 = w_o \cdot q_{j(r=1)} + \sum_{j=1}^N q_j w_j \quad (31)$$

$$\bar{C}_1 = w_o \cdot C_{j(r=1)} + \sum_{j=1}^N C_j w_j \quad (32)$$

$$\bar{q}_1 = \sum_{j=1}^N q_j w_j \quad (33)$$

onde:

N: número de pontos de colocação;

w_j : pesos da quadratura de Radau (Equações 31 e 32) ou Gauss (Equação 33);

O cálculo de \bar{C}_1 pode ser facilmente realizado utilizando-se a Equação 32. Nesse trabalho \bar{q}_1 e \bar{q}_2 foram obtidos pela Equação 33.

(B) Balanço para o eluente:

$$\frac{dC_{E1}}{dt} = \frac{-C_{E1} (\theta s_1 - \theta r_1)}{(\theta s_1 - \theta r_1)} + \frac{1}{\theta s_1} (C_{E2} - C_{E1}) \quad (34)$$

(C) Balanço para os contaminantes inertes:

$$\frac{dC_{T1}}{dt} = \frac{(C_{T0} - C_{T1})(\theta_{s1} - \theta_{r1})}{\theta_{s1} \theta_{r1}} + \frac{1}{\theta_{s1}} (C_{T2} - C_{T1}) \quad (35)$$

5.3.2 SEGUNDO ESTÁGIO:**(A) Balanço para AC:**

Difusão intraparticular

$$\varepsilon_p \frac{\partial C_{i2}}{\partial t} = D_{ef2} \varepsilon_p \left(\frac{\partial^2 C_{i2}}{\partial r^2} + \frac{2}{r} \frac{\partial C_{i2}}{\partial r} \right) - (1 - \varepsilon_p) r q_{i2} \quad (36)$$

$$r q_{i2} = -k_3 q_{i2} \quad (37)$$

Condições iniciais e de contorno:

$$t = 0 \rightarrow q_{i2} = C_{i2} = 0 \quad (38)$$

$$r = 0 \rightarrow \frac{\partial C_{i2}}{\partial r} = 0 \quad (39)$$

$$r = R \rightarrow \frac{\partial C_{i2}}{\partial r} = \frac{k_{s2}}{\varepsilon_p D_{ef2}} (C_2 - C_{s2}) \quad (40)$$

Fase líquida

$$\frac{dC_2}{dt} = \frac{-C_2 (\theta_{s2} - \theta_{r2})}{\theta_{s2} \theta_{r2}} + \frac{1}{\theta_{s2}} (C_2 - C_1) + [k_3 \bar{q}_2] \frac{(1 - \varepsilon_r)}{\varepsilon_r} \quad (41)$$

Fase sólida

$$\frac{d\bar{q}_2}{dt} = \frac{1}{\theta s_2} (\bar{q}_1 - \bar{q}_2) - k_3 \bar{q}_2 \quad (42)$$

Aqui, \bar{C}_2 e \bar{q}_2 são calculados da mesma forma que no primeiro estágio.

(B) Balanço eluente:

$$\frac{dC_{E2}}{dt} = \frac{(C_{E0} - C_{E2})(\theta s_2 - \theta r_2)}{(\theta s_2 \theta r_2)} + \frac{1}{\theta s_2} (C_{E1} - C_{E2}) \quad (43)$$

(C) Balanço para os contaminantes inertes:

$$\frac{dC_{T2}}{dt} = - \frac{C_{T2}(\theta s_2 - \theta r_2)}{(\theta s_2 \theta r_2)} + \frac{1}{\theta s_2} (C_{T1} - C_{T2}) \quad (44)$$

O modelo está representado por equações diferenciais parciais (Equações 24 e 36) e essas equações são reduzidas à equações diferenciais ordinárias pelo método de colocação ortogonal. O conjunto de equações diferenciais ordinárias por sua vez foi resolvido pelo método de Runge-kutta de 4ª ordem.

As equações diferenciais podem ser resolvidas no estado estacionário, e C_1 e C_2 podem ser obtidas para condições operacionais definidas tendo como respostas parâmetros importantes tais como, rendimento (Y), fator de purificação (FP) e fator de concentração (FC), definidos pelas Equações 45, 46 e 47, respectivamente.

$$Y = 100 \frac{C_2 F_2}{C_0 F_1} \quad (45)$$

$$FP = \frac{C_2 \cdot C_{To}}{C_0 \cdot C_{T2}} \quad (46)$$

$$FC = \frac{C_2}{C_0} \quad (47)$$

A modelagem e simulação para este processo é de primordial importância para o estudo de otimização das variáveis de operação que maximizem esses fatores. Essas variáveis uma vez otimizadas e definidas possibilitam a implementação deste processo em escala experimental, o que seria difícil sem este prévio estudo relacionado à modelagem e simulação.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste item os resultados obtidos no decorrer deste trabalho estão relatados. É importante salientar que todos os testes preliminares para escolha do melhor adsorvente foram realizados com o AC.1. Escolhido o adsorvente, foram feitos estudos cinéticos (adsorção e dessorção) e de equilíbrio de adsorção ainda com o AC.1. A cinética de hidrólise foi estudada utilizando-se AC.1, AC.2 e o AC proveniente da fermentação. Após a realização de vários testes iniciais, partiu-se para o estudo das cinéticas de adsorção e dessorção de amostras de AC de fermentação em batelada em tanque agitado. A modelagem e simulações do processo de adsorção foram realizadas tanto para o processo em batelada quanto para o processo contínuo e os dados simulados foram comparados com os experimentais. A otimização dos parâmetros do processo contínuo foi realizada e este processo foi comparado com o processo de adsorção em leito fixo.

6.1 ENSAIO EM TANQUE AGITADO EM BATELADA

6.1.1 RESINA IRA 400

Foram feitos testes com a resina de troca iônica Amberlite IRA 400. Esse tipo de resina pode ser regenerada tanto com solução de NaCl (ciclo cloreto) como com solução de NaOH (ciclo hidroxila). Quando essa resina é regenerada com solução de NaCl, é possível remover ânions mais seletivos tais como SO_4^{-2} , NO_3^- , PO_4^{-3} capazes de deslocar os íons cloreto da resina. Quando se quer remover ânions menos seletivos deve-se trabalhar no ciclo hidroxila pois todos os ânions em solução são removidos desde que a solução esteja em pH ácido (Rohm & Haas).

(A) Ciclo hidroxila

Para utilização da resina IRA 400 no ciclo hidroxila é necessário que esta seja inicialmente tratada com solução de NaOH 5% (p/v) por cerca de 1 hora com auxílio de um agitador magnético. Em seguida a solução de soda foi drenada e a resina lavada com água milli-Q para retirar o excesso de NaOH. Essa lavagem com água foi realizada até que o pH fique neutro. Porém quando ocorre o processo de troca iônica o pH do meio volta a aumentar devido à liberação de íons OH^- .

No ensaio em batelada EB-15 trabalhou-se com a resina IRA 400 no ciclo hidroxila utilizando-se uma solução de ácido clavulânico (AC.1) com pH inicial 7,0 e concentração inicial de 90,84 mg/L. A massa de 5 g de resina foi colocada em um tanque agitado a 10°C juntamente com 100 mL da solução de AC. Amostras foram retiradas e analisadas em HPLC. A Figura 6.1 mostra os resultados do processo de adsorção para este ensaio.

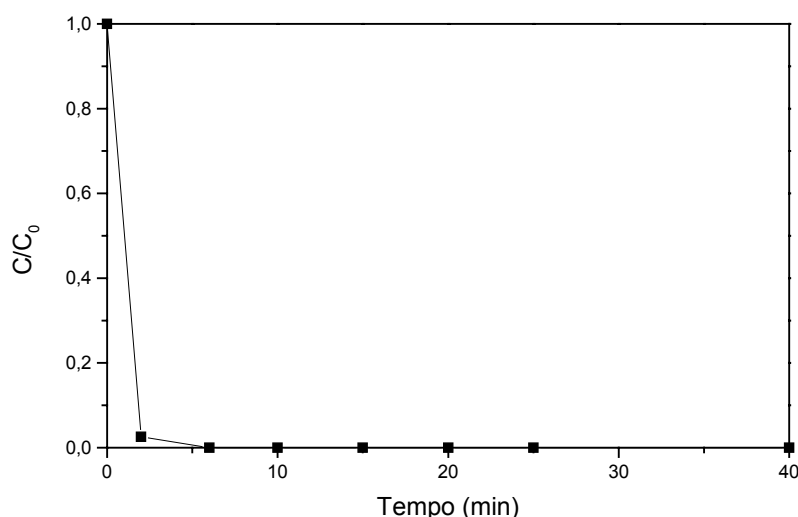


Figura 6.1: Ensaio em batelada EB-15 com a resina IRA 400 no ciclo hidroxila em pH=7,0 e $C_0=90,84$ mg/L. Etapa de adsorção.

Na Figura 6.1 pode-se observar que a concentração de ácido clavulânico em solução caiu para zero em aproximadamente 5 minutos após o início do processo. Após a adsorção, drenou-se a solução exaurida do tanque, lavou-se a resina com água milli-Q e adicionou-se cerca de 100 mL de solução de NaCl 10%. Nessa etapa também foram retiradas amostras e essas foram analisadas em HPLC. Porém, não foi possível efetuar a eluição do AC. A análise das amostras retiradas não detectou a presença de AC nem na

etapa de eluição nem na etapa de lavagem. Esse ensaio foi repetido, porém obtendo-se os mesmos resultados. Dessa forma foi possível concluir que possivelmente o AC foi degradando devido à liberação de íons OH^- dos sítios da resina com conseqüente aumento de pH.

Testes de adsorção de ácido clavulânico puro foram também realizados com a resina Amberlite IRA 400 no ciclo cloreto e com a resina hidrofóbica Amberlite XAD-4.

(B) Ciclo cloreto

O ensaio EB-17 foi realizado com 5 g de resina IRA 400 tratada com solução 10% de NaCl (p/v) por cerca de 1 hora. A solução de ácido clavulânico (AC.1) estava com pH inicial 7,0 e concentração inicial de 92,84 mg/L. A resina foi colocada em um tanque agitado a 10°C juntamente com 100 mL desta solução de AC. Amostras foram retiradas em intervalos de tempo determinados e analisadas em HPLC. A Figura 6.2 mostra os resultados obtidos neste ensaio.

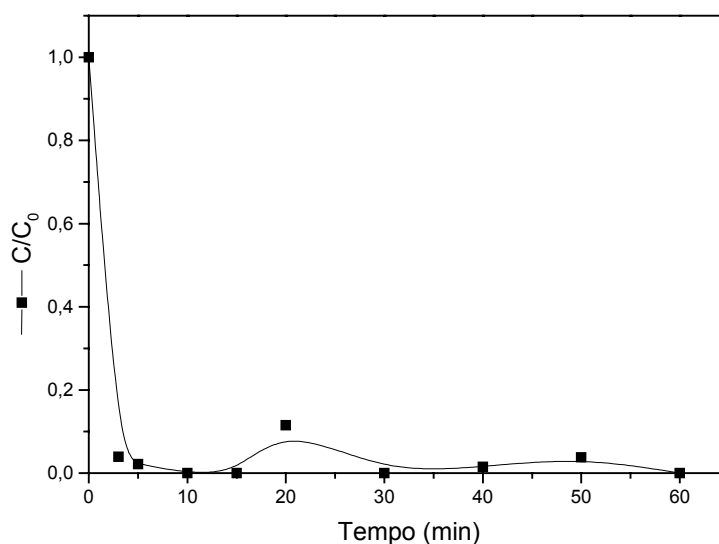


Figura 6.2: Ensaio em batelada EB-17 com a resina IRA 400 no ciclo cloreto em pH=7,0 e $C_0=92,84$ mg/L. Etapa de adsorção.

Pela Figura 6.2 pode-se observar que, semelhante ao resultado da Figura 6.1, a concentração de ácido clavulânico em solução caiu para zero em menos de 5 minutos

após o início do ensaio. Após a adsorção, drenou-se a solução exaurida do tanque, lavou-se a resina com água milli-Q e adicionou-se cerca de 100 mL de solução de NaCl 10% (p/v) mantendo-se a temperatura 10°C. Nessa etapa também foram retiradas amostras e essas foram analisadas em HPLC. A etapa de dessorção ou eluição está representada na Figura 6.3.

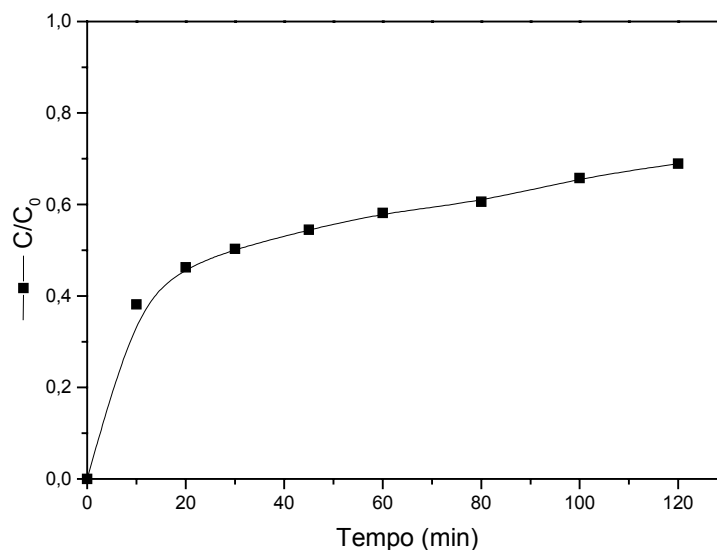


Figura 6.3: Ensaio em batelada EB-17 com a resina IRA 400 no ciclo cloreto em pH=7,0 e $C_0=92,84$ mg/L. Etapa de dessorção.

Visualizando-se a Figura 6.3 pode-se observar que, diferentemente do que ocorreu com essa resina no ciclo hidroxila, foi possível efetuar a eluição do AC já que não houve aumento do pH durante o processo. A eluição foi uma etapa mais lenta que a adsorção, visto que em cerca de 2 horas não foi possível eluir todo ácido clavulânico adsorvido. Esse fato ocorreu possivelmente por causa da forte atração eletrostática entre as moléculas de AC e os sítios carregados da resina, outro fator se deve à degradação de AC devido aos sítios ativos da resina (Mayer et al., 1996) ou pelo fato de que nessas condições de temperatura, pH e concentração de eluente o tempo de eluição de todo AC adsorvido é maior que 120 min.

Desse primeiro ensaio em batelada com a resina IRA 400 no ciclo cloreto, observando-se as etapas de adsorção e dessorção, pode-se concluir que a velocidade em que o ácido clavulânico é adsorvido é bastante rápida, sendo que em aproximadamente

5 minutos o equilíbrio já foi atingido. No entanto, a velocidade com que o antibiótico é desorvido é bem mais lenta, mais de 2 horas. Para se aumentar a velocidade de desorção pode-se alterar a concentração de eluente ou modificar as condições de operação, como por exemplo o aumento a temperatura.

6.1.2 RESINA XAD-4

O ensaio em batelada EB-16 foi feito como teste para o uso da resina hidrofóbica Amberlite XAD-4 na adsorção de ácido clavulânico. Esta resina deve ser pré-tratada com etanol puro por cerca de 1 hora e depois lavada várias vezes com água destilada.

No ensaio EB-16 trabalhou-se com a resina XAD-4 utilizando-se uma solução de ácido clavulânico (AC.1) em pH inicial 7,0 e concentração inicial de 120,88 mg/L. Uma massa de resina de 5 g foi pesada e pré-tratada como descrito acima, essa massa foi colocada em um tanque agitado a 10°C juntamente com 100 mL da solução de AC. Amostras foram retiradas de tempos em tempos e analisadas em HPLC. A Figura 6.4 mostra os resultados do processo de adsorção para este ensaio.

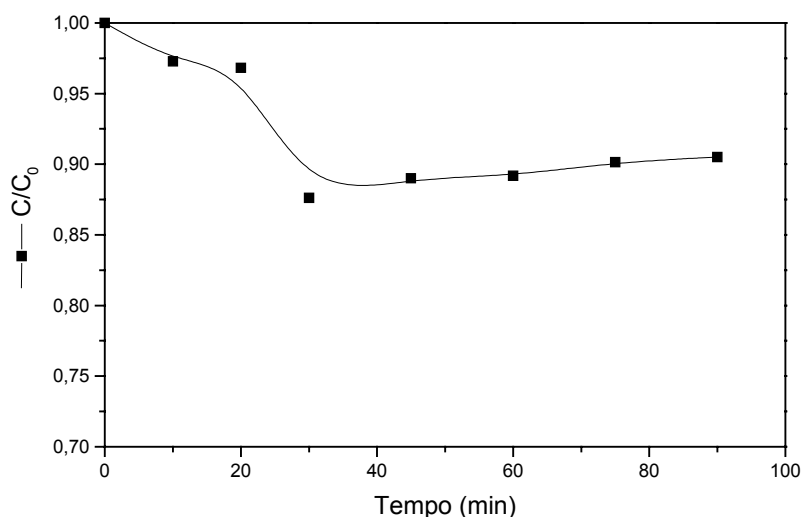


Figura 6.4: Ensaio em batelada EB-16 com a resina XAD-4 em pH=7,0 e C₀=120,88 mg/L. Etapa de adsorção.

A partir da Figura 6.4 pode-se observar que cerca de 10% de ácido clavulânico presente em solução foi adsorvido pela resina em aproximadamente 50 minutos de ensaio. A etapa de dessorção do ensaio EB-16 é mostrada pela Figura 6.5. O eluente utilizado, neste caso, foi etanol 10% (v/v) em tampão fosfato pH 7,0, a temperatura foi mantida 10°C. A Figura 6.5 mostra que a eluição é também para essa resina uma etapa lenta e que em cerca de 100 min não foi possível eluir todo AC adsorvido. Esse fato se deve em parte à degradação do antibiótico, porém devem haver diferentes condições de temperatura, pH e concentração de eluente que melhorem o tempo de eluição.

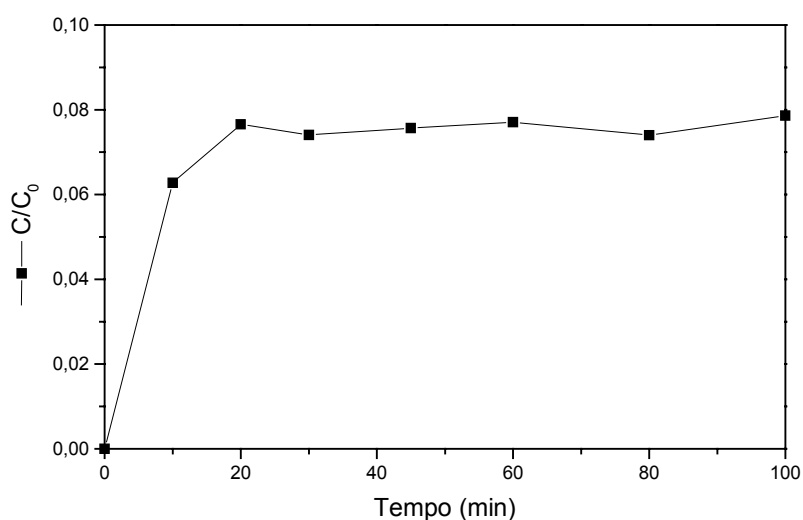


Figura 6.5: Ensaio em batelada EB-16 com a resina XAD-4 em pH=7,0 e $C_0=120,88$ mg/L. Etapa de dessorção.

A utilização da resina XAD-4 não acarreta elevação do pH diminuindo a velocidade de degradação do antibiótico. No entanto, a quantidade de antibiótico adsorvida por esta resina é muito pequena em relação à utilização da resina IRA 400 no ciclo cloreto, na qual o pH também permanece constante. Assim optou-se pela utilização desta última resina para aplicação em processos contínuos. Para investigar aspectos da utilização da resina IRA 400-Cl alguns estudos cinéticos bem como estudos do comportamento do equilíbrio de adsorção do AC foram realizados nessa resina. Os itens 6.2 e 6.3 referem-se ao estudo cinético e de equilíbrio de adsorção, respectivamente, do AC puro na resina IRA 400 no ciclo cloreto.

6.2 CINÉTICAS DE ADSORÇÃO E DESSORÇÃO DE AMOSTRAS DE AC PURO

No item anterior pôde-se concluir que a resina mais adequada para ser utilizada no processo de adsorção de ácido clavulânico foi a resina de troca iônica Amberlite IRA 400 carregada com íons cloreto. Com essa resina o processo de troca iônica é bastante rápido e o pH se mantém constante durante todo o processo de adsorção diminuindo a velocidade de degradação de AC. Assim, foram feitos diversos testes para o estudo cinético de adsorção e de dessorção de AC nessa resina, estudando-se a influência da concentração inicial de AC, da fonte de AC, da temperatura e da concentração de eluente, no caso solução de NaCl.

6.2.1 INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO INICIAL

O ensaio EB-18 foi realizado nas mesmas condições de temperatura e pH do ensaio EB-17 na etapa de adsorção, porém a concentração inicial da solução de AC.1 foi de 963,3 mg/L, ou seja, cerca de 10 vezes maior que a concentração inicial do ensaio EB-17. A comparação entre esses dois ensaios encontra-se na Figura 6.6.

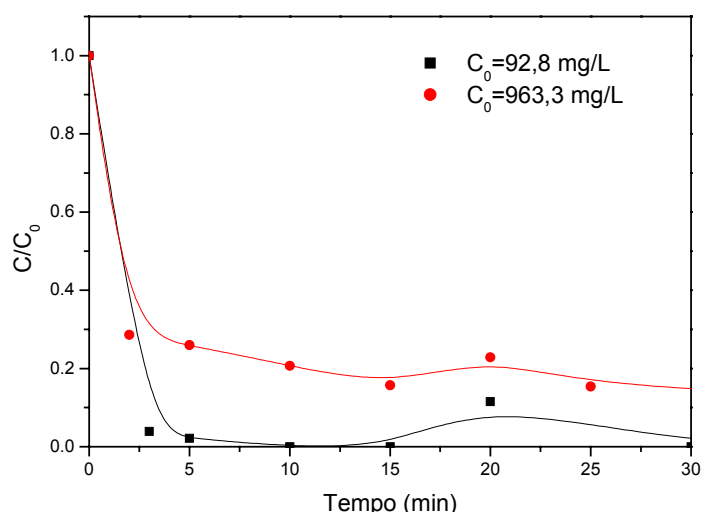


Figura 6.6: Ensaio de adsorção em batelada de ácido clavulânico na resina IRA 400-Cl. Comparação de diferentes concentrações iniciais de AC.

Na Figura 6.6 observar-se que no ensaio EB-17 todo AC presente em solução foi adsorvido pela resina em cerca de 5 minutos, porém no ensaio EB-18 apenas cerca de 80% de AC em solução foi adsorvido. Esse fato mostra que a capacidade máxima de adsorção da resina foi atingida e portanto sua saturação. O valor da capacidade de adsorção desta resina foi definido através da obtenção da isoterma de equilíbrio a esta temperatura (10°C) e pH (7,0). Apesar de 20% de AC não ter sido adsorvido no ensaio EB-18, o equilíbrio é atingido praticamente nos mesmos cinco minutos do ensaio EB-17. Não foi possível comparar o efeito da concentração inicial na etapa de eluição pois, nesta etapa, os ensaios foram realizados em temperaturas diferentes.

6.2.2 INFLUÊNCIA DA FONTE DE ÁCIDO CLAVULÂNICO

Na Figura 6.7 tem-se uma comparação entre os ensaios EB-17 e EB-20. No ensaio EB-20 foram utilizadas as mesmas condições de pH e temperatura do ensaio EB-17 na etapa de adsorção, porém as fontes de AC foram diferentes. No ensaio EB-17 foi utilizada uma solução de AC.1 de concentração inicial 92,84 mg/L e no ensaio EB-20 foi utilizada uma solução de AC.2 de 117,9 mg/L de concentração inicial. Essa comparação foi feita para investigar a influência da presença de amoxicilina no processo de adsorção.

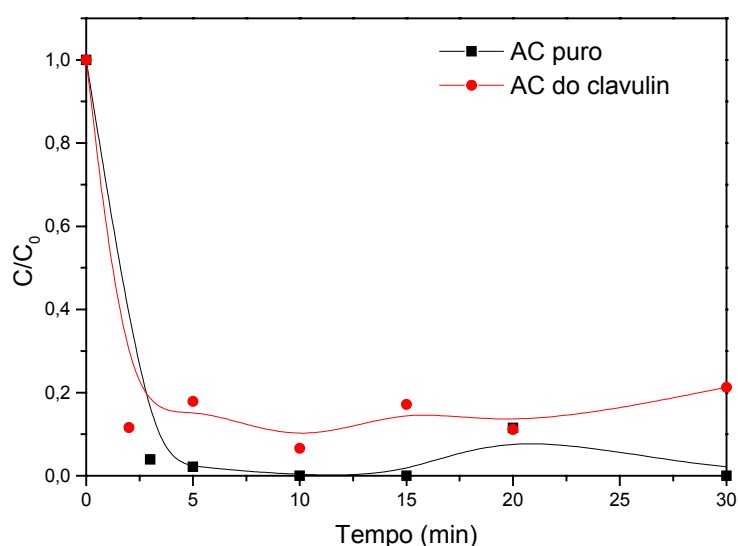


Figura 6.7: Ensaio de adsorção em batelada de ácido clavulânico na resina IRA 400-Cl. Comparação de diferentes fontes AC.

Pela Figura 6.7 pode-se observar que no caso do AC.2 cerca de 85% do AC foi adsorvido em cerca de 5 minutos na resina utilizada. Esse fato se deve provavelmente a presença de amoxicilina (4 vezes a concentração inicial de AC) e de outros compostos presentes na fórmula do produto farmacêutico Clavulin® que influenciam no processo de adsorção do ácido clavulânico. Além disso a concentração de AC no ensaio EB-20 foi cerca de 25% maior que no ensaio EB-17, podendo ter havido a saturação da resina. Não foi possível comparar o efeito da fonte de AC na etapa de eluição pois, nesta etapa, os ensaios foram realizados em temperaturas diferentes. Os estudos cinéticos subsequentes foram todos realizados com ácido clavulânico puro (AC.1).

6.2.3 INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA

A influência da temperatura no processo de troca iônica em batelada de ácido clavulânico na resina IRA 400-Cl foi estudada tanto na etapa de adsorção como na etapa de dessorção.

(A) Etapa de adsorção

Na etapa de adsorção foram feitos 5 ensaios variando-se a temperatura de adsorção. As condições de temperatura e concentração inicial desses ensaios estão descritas na Tabela 6.1. Os resultados experimentais obtidos para esses ensaios estão representados na Figura 6.8.

Tabela 6.1: Condições de temperatura e concentração inicial para o estudo da influência da temperatura na etapa de adsorção.

Ensaio	Temperatura	Concentração inicial
EB-26	5°C	108,10mg/L
EB-22	10°C	97,98 mg/L
EB-27	20°C	98,41 mg/L
EB-25	23°C	104,40 mg/L
EB-24	30°C	89,02 mg/L

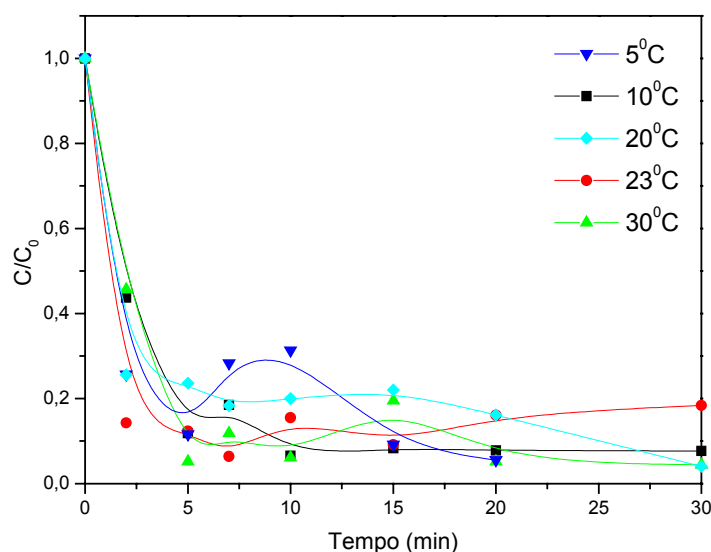


Figura 6.8: Ensaio de adsorção em batelada de ácido clavulânico na resina IRA 400-Cl. Comparação de diferentes temperaturas na etapa de adsorção.

Pelos resultados apresentados na Figura 6.8 não se pode observar a influência da temperatura no processo de troca iônica de AC na resina IRA 400-Cl durante a etapa de adsorção, pois as diferenças ficam dentro do erro experimental das análises. Por este fato pode-se então escolher uma temperatura que minimize a degradação do ácido clavulânico (ver item 6.4). Contudo não há necessidade de se trabalhar em temperaturas muito baixas, controlando-se os gastos com refrigeração do processo. Para o processo de adsorção contínuo do ácido clavulânico foi escolhida a temperatura de 10°C para a etapa de adsorção.

(B) Etapa de dessorção

Na etapa de dessorção foram feitos apenas 2 ensaios com diferentes temperaturas de dessorção utilizando-se a mesma concentração de eluente, solução 10% de NaCl (p/v). As condições de temperatura e concentração inicial desses ensaios estão descritas na Tabela 6.2.

Tabela 6.2: Condições de temperatura e concentração inicial para o estudo da influência da temperatura na etapa de dessorção.

Ensaio	Temperatura	Concentração inicial
EB-17	10°C	92,84 mg/L
EB-21	30°C	103,3 mg/L

A comparação entre os resultados experimentais da etapa de dessorção destes dois ensaios está apresentada na Figura 6.9. Observando-se a Figura 6.9 foi possível concluir que a temperatura tem influência na etapa de dessorção de AC na resina IRA 400-Cl. Quando utilizou-se a temperatura de 30°C foi possível eluir uma quantidade de AC aproximadamente 20% maior que a eluída quando utilizou-se uma temperatura de 10°C no mesmo tempo de processo.

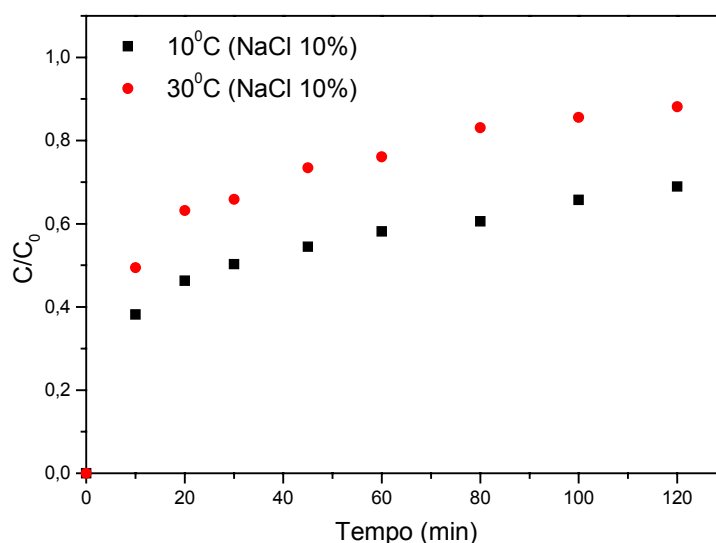


Figura 6.9: Ensaio de adsorção em batelada de ácido clavulânico na resina IRA 400-Cl. Comparação de diferentes temperaturas na etapa de dessorção.

A etapa de dessorção continua muito mais lenta que a etapa de adsorção, porém o aumento de temperatura favoreceu a dessorção do antibiótico. A única desvantagem do aumento de temperatura na etapa de dessorção é o aumento da velocidade de degradação de AC (ver item 6.4) durante a etapa mais longa do processo. Para o estudo cinético em tanque agitado utilizou-se a temperatura de 30°C nas eluições.

6.2.4 INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DE ELUENTE

Ainda durante os estudos cinéticos da adsorção de ácido clavulânico na resina IRA 400-Cl foi possível avaliar a influência da concentração do eluente utilizado no processo, ou seja, solução de NaCl na etapa de adsorção e dessorção do processo em tanque agitado. Essa influência é de fundamental importância para o estudo do processo contínuo de adsorção, uma vez que, no processo contínuo, o estágio de adsorção é ligado através de reciclo de resina com o estágio de dessorção. Dessa forma, é importante que na etapa de dessorção seja utilizada uma menor concentração possível de eluente. Assim, quando uma parte desse eluente for transferida no reciclo juntamente com a resina para o primeiro estágio essa concentração de solução de NaCl não prejudique a etapa de adsorção, pela diminuição da capacidade de adsorção da resina.

(A) Etapa de adsorção

Foram feitos ensaios em tanque agitado contendo determinadas concentrações de solução de NaCl durante a etapa de adsorção de AC na resina IRA 400-Cl. As condições de concentração inicial de AC e concentração de solução de NaCl no processo estão descritas na Tabela 6.3. Todos os ensaios foram realizados a 10°C e pH 6,2. Os resultados experimentais destes ensaios podem ser comparados observando-se a Figura 6.10.

Tabela 6.3: Condições de concentração de solução de NaCl e concentração inicial para o estudo da influência da concentração de solução de NaCl na etapa de adsorção.

Ensaio	Concentração de NaCl	Concentração inicial
EB-22	0% NaCl	97,98 mg/L
EB-28	0,1% NaCl	109,35 mg/L
EB-23	1% NaCl	99,04 mg/L

A Figura 6.10 nos mostra que a presença de solução de apenas 1% de NaCl (p/v) na etapa de adsorção foi bastante prejudicial para o processo de adsorção de AC na resina IRA 400-Cl acarretando na adsorção de apenas 10% de AC presente em solução. Quando a concentração de solução de NaCl presente na adsorção é de 0,1%, ou seja, 10

vezes menor do que a do ensaio EB-23 a adsorção é de 60% do ácido clavulânico presente em solução. Nesse caso a capacidade de adsorção de AC pela resina também diminui, porém não tanto quanto no ensaio EB-23. Portanto, deve-se utilizar na dessorção do processo contínuo a menor concentração de solução de NaCl para que a adsorção não seja prejudicada durante o processo. Essa concentração poderá ser estabelecida analisando-se os dados experimentais do item seguinte (6.2.4(B)).

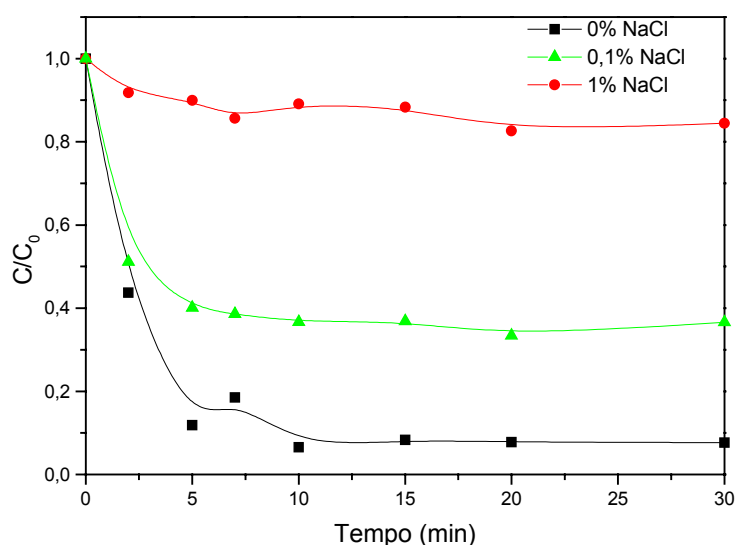


Figura 6.10: Ensaio de adsorção em batelada de ácido clavulânico na resina IRA 400-Cl. Comparação de diferentes concentrações de solução de NaCl na etapa de adsorção.

(B) Etapa de dessorção

Nos primeiros ensaios em batelada realizados inicialmente, utilizou-se uma concentração de 10% de solução de NaCl (p/v) na etapa de dessorção, porém era necessário investigar se essa concentração não estava sendo excessiva. Para essa investigação foram realizados seis ensaios com diferentes concentrações de eluente na etapa de dessorção que estão listados na Tabela 6.4. Para todos os ensaios foi utilizada a temperatura de 30°C devido aos resultados obtidos no item 6.2.3(B). Os resultados desta investigação estão apresentados na Figura 6.11.

Tabela 6.4: Condições de concentração de solução de NaCl e concentração inicial para o estudo da influência da concentração de solução de NaCl na etapa de dessorção.

Ensaio	Concentração de NaCl	Concentração inicial
EB-21	10% NaCl	103,30mg/L
EB-22	5% NaCl	97,98 mg/L
EB-24	3% NaCl	89,02 mg/L
EB-25	2% NaCl	104,40 mg/L
EB-27	1,5% NaCl	98,41 mg/L
EB-26	1% NaCl	108,10 mg/L

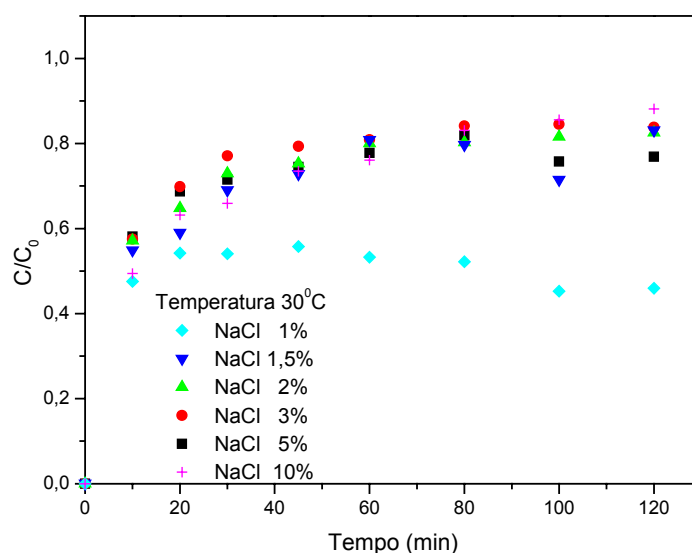


Figura 6.11: Ensaio de adsorção em batelada de ácido clavulânico na resina IRA 400-Cl. Comparação de diferentes concentrações de solução de NaCl na etapa de dessorção.

Na Figura 6.11 pode-se analisar que a concentração de solução de NaCl de 10% (p/v) inicialmente utilizada era realmente excessiva e que uma concentração de até 1,5% já foi suficiente para efetuar eficientemente a etapa de dessorção de ácido clavulânico dentro da faixa de concentração inicial utilizada (100 mg/L). Porém a utilização de uma concentração de 1% (p/v) de solução NaCl como eluente na etapa de dessorção de AC não foi suficiente para realizar uma dessorção eficiente no tempo e na faixa de concentração inicial utilizados. Portanto, no processo contínuo, escolheu-se trabalhar

com uma concentração de 2% (p/v) de solução de NaCl no segundo estágio, para que se tenha uma eluição eficiente.

6.3 ISOTERMAS DE ADSORÇÃO

Foram obtidas isotermas de adsorção de ácido clavulânico puro em resina de troca iônica IRA 400 no ciclo cloreto em algumas temperaturas para verificar a influência deste fator no equilíbrio de adsorção. Utilizou-se o modelo de Langmuir (Equação 1) para representar matematicamente esses dados de equilíbrio para que fosse possível avaliar o processo levando-se em consideração os termos q_m , máxima capacidade de adsorção, e K_D , que é a constante de equilíbrio. A Tabela 6.5 mostra os valores desses parâmetros obtidos a partir da isoterma de Langmuir.

Tabela 6.5: Parâmetros da isoterma de equilíbrio segundo modelo de Langmuir para diferentes temperaturas (Barboza et al., 2003).

Temperatura (°C)	$q_m \cdot 10^2$ (g _{AC} /g _{res})	$K_D \cdot 10^2$ (g/L)
5	1,51	3,14
10	2,28	3,94
23	2,46	7,22
30	2,67	8,63

Ao se analisar os parâmetros da Tabela 6.5 pode-se dizer que, como já era esperado, a capacidade máxima de adsorção é praticamente independente da temperatura dentro da faixa estudada. Esse fato já era esperado uma vez que esse parâmetro depende muito da capacidade física da resina, como quantidade e tamanho de poros. A partir dos valores de K_D obtidos pode-se observar que o aumento da temperatura torna o processo de adsorção desfavorável. Este comportamento pode estar relacionado ao estado de agitação das moléculas iônicas (AC^- e Cl^-) que se ligam aos sítios carregados da resina. Com temperaturas mais elevadas a frequência de choques deve ser maior favorecendo a ocorrência da adsorção no sentido inverso, ou seja, favorecendo a dessorção. A Figura 6.12 mostra a regressão não-linear dos dados experimentais das isotermas de adsorção a 5, 10, 23 e 30°C de acordo com o modelo de Langmuir.

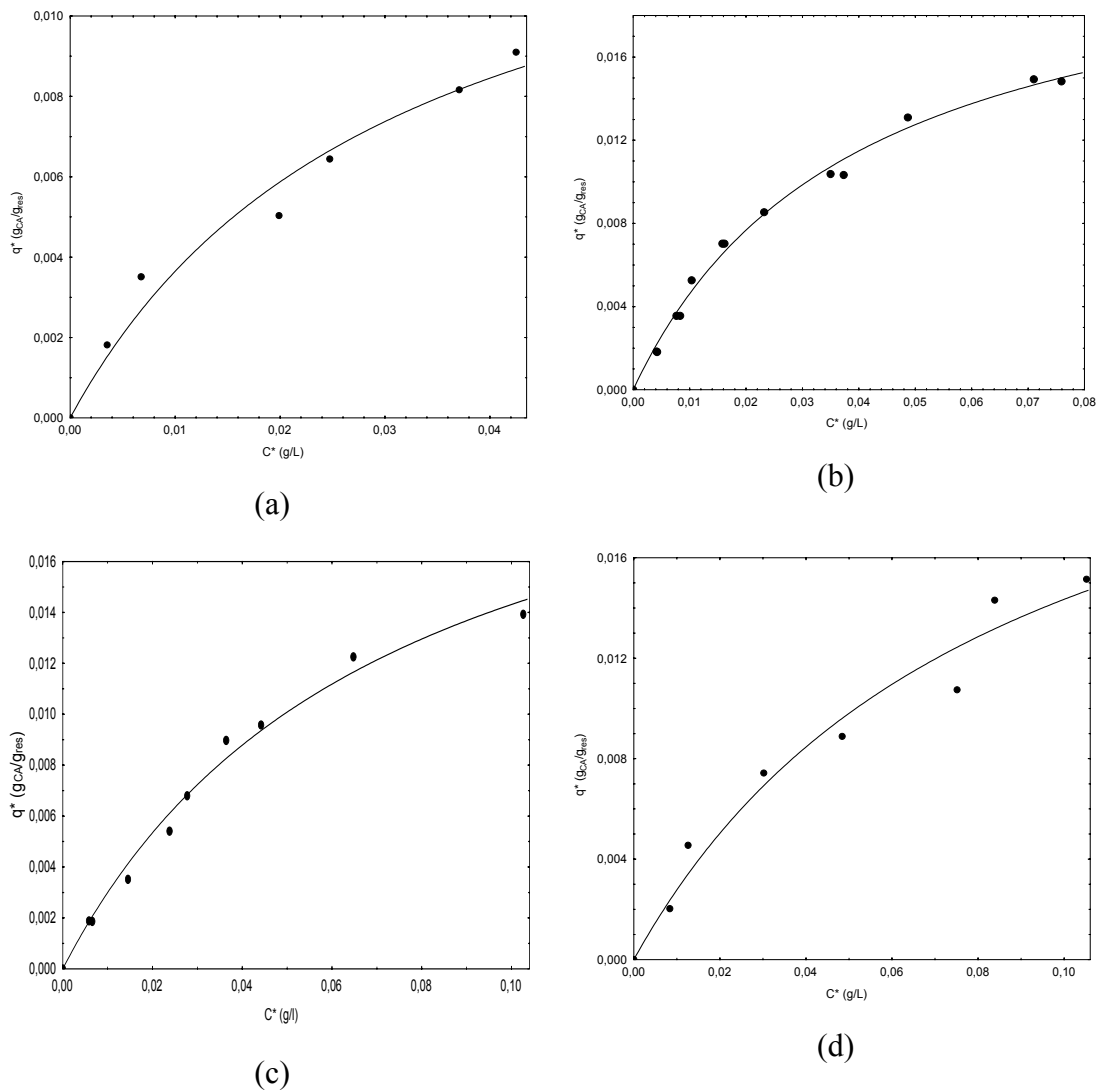


Figura 6.12: Regressão não-linear dos dados experimentais das isotermas de adsorção de AC na resina IRA 400-Cl. (a) $T=5^\circ\text{C}$ ($r^2=0,975$); (b) $T=10^\circ\text{C}$ ($r^2=0,993$); (c) $T=23^\circ\text{C}$ ($r^2=0,989$); (d) $T=30^\circ\text{C}$ ($r^2=0,969$) (Barboza et al., 2003).

A partir da aquisição desses dados experimentais de cinética e equilíbrio foi possível utilizar o modelo matemático proposto no item 5.1, podendo-se comparar os dados experimentais com os simulados (ver item 6.7.1(A)).

6.4 CINÉTICA DE HIDRÓLISE

Com o objetivo de determinar qual a melhor condição de temperatura para se utilizar no processo de adsorção de AC na resina IRA 400 no ciclo cloreto foi

necessário um estudo da cinética de hidrólise desse antibiótico em algumas temperaturas. A condição de pH de maior estabilidade do ácido clavulânico já é conhecida como sendo em pH em torno de 6,0 (Bersanetti et al., 2000).

6.4.1 DEGRADAÇÃO DE ÁCIDO CLAVULÂNICO EM SOLUÇÃO AQUOSA

Os dados experimentais da concentração de AC (AC.1 e AC.2) não degradado ilustrados nas Figuras 6.13 e 6.14 para pH 6,2 e 7,0, respectivamente, mostram que o processo de degradação de ácido clavulânico em solução aquosa obedece a cinética de pseudoprimera ordem representada na Equação 6. As linhas contínuas nas Figuras 6.13 e 6.14 representam o ajuste linear aos dados experimentais para cada temperatura.

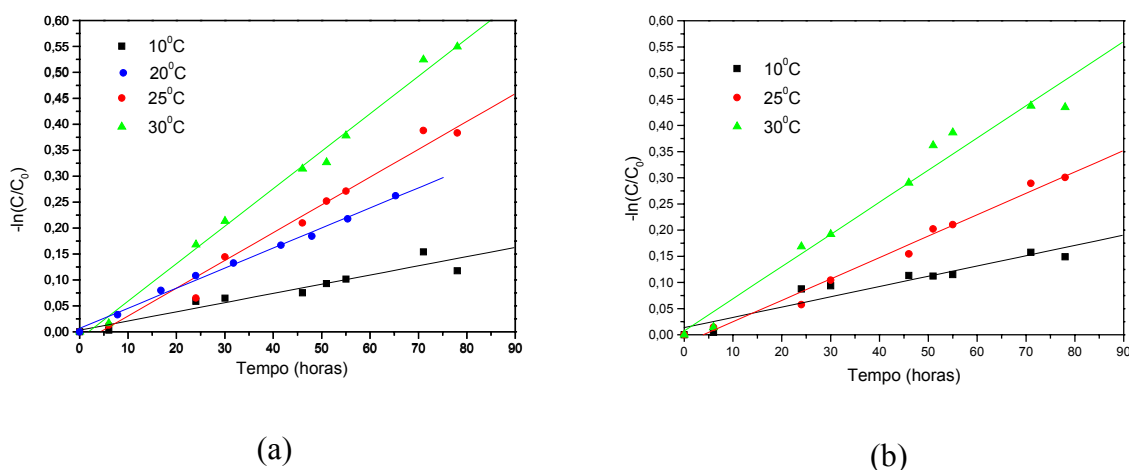


Figura 6.13: Hidrólise de ácido clavulânico, pH 6,2, em diferentes temperaturas. (a) AC.1; (b) AC.2.

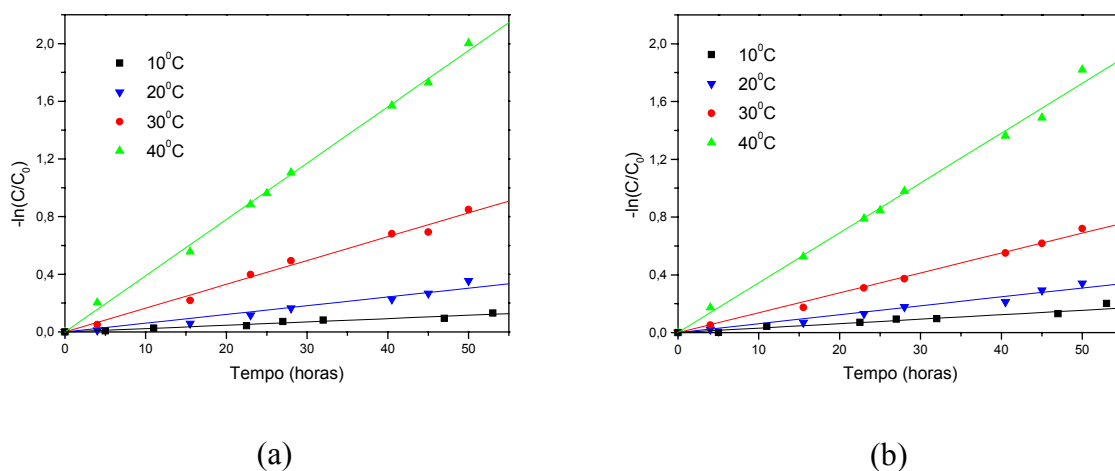


Figura 6.14: Hidrólise de ácido clavulânico, pH 7,0, em diferentes temperaturas. (a) AC.1; (b) AC.2.

As constantes cinéticas de degradação (k), estimadas a partir do ajuste linear dos resultados experimentais das Figuras 6.13 e 6.14 para cada temperatura, estão apresentadas nas Tabelas 6.6 e 6.7 para pH 6,2 e pH 7,0, respectivamente.

Tabela 6.6: Constante cinética de hidrólise pH 6,2 (a) AC.1 e (b) AC.2.

Temperatura (°C)	(a) $k - AC.1 (h^{-1})$	(b) $k - AC.2 (h^{-1})$
10 ($r^2 = 0,958$)	$0,00177 \pm 0,00020$	$0,00196 \pm 0,00023$
20 ($r^2 = 0,997$)	$0,00383 \pm 0,00011$ (*)	$0,00336$ (**)
25 ($r^2 = 0,990$)	$0,00535 \pm 0,00017$	$0,00409 \pm 0,00019$
30 ($r^2 = 0,998$)	$0,00723 \pm 0,00012$	$0,00614 \pm 0,00042$

(*) Resultado obtido da literatura (Bersanetti et al., 2000)

(**) Valor estimado pela equação de Arrhenius (ver Tabela 6.10)

Tabela 6.7: Constante cinética de hidrólise pH 7,0 (a) AC.1 e (b) AC.2.

Temperatura (°C)	(a) $k - AC.1 (h^{-1})$	(b) $k - AC.2 (h^{-1})$
10 ($r^2 = 0,983$)	$0,00234 \pm 0,00018$	$0,00344 \pm 0,00032$
20 ($r^2 = 0,983$)	$0,00668 \pm 0,00051$	$0,00654 \pm 0,00026$
30 ($r^2 = 0,996$)	$0,01672 \pm 0,00064$	$0,01422 \pm 0,00039$
40 ($r^2 = 0,999$)	$0,03907 \pm 0,00071$	$0,03447 \pm 0,00049$

Comparando-se a Tabela 6.6(a), as constantes cinéticas do AC.1 em pH 6,2 a diferentes temperaturas, com a Tabela 6.7(a), os mesmos parâmetros de AC.1 em pH 7,0, é possível observar que as constantes cinéticas em pH 7,0 são consideravelmente mais altas que aquelas obtidas em pH 6,2. Essa diferença aumenta com o aumento da temperatura, ou seja, a diferença é de 1,3 vezes a 10°C e de 2,3 vezes a 30°C maior em pH 7,0. O mesmo fato também ocorreu com o AC.2 como pode ser observado quando se compara a Tabela 6.6(b) com a Tabela 6.7(b) (1,7 vezes a 10°C e 2,3 vezes a 30°C). Essa observação serviu para confirmar, como outros autores citaram, que a maior estabilidade de AC ocorre em pH de aproximadamente 6,0, porém essa estabilidade diminui com o aumento da temperatura independente da fonte de onde se obteve o antibiótico.

Continuando a análise dos valores de k nas Tabelas 6.6 e 6.7, pode-se observar que em temperaturas acima de 10°C a estabilidade do AC.2 é maior que do AC.1 nos

dois valores de pH estudados. Esse fato é provavelmente devido à presença de alguns componentes na fórmula do produto farmacêutico Clavulin® que torna o ácido clavulânico menos instável em temperaturas ambientes, temperaturas estas nas quais o produto farmacêutico deve ser armazenado.

6.4.2 DEGRADAÇÃO DE AMOSTRAS DE ÁCIDO CLAVULÂNICO DE FERMENTAÇÃO

No estudo da hidrólise de AC em meio fermentado (AC.3), o processo de degradação foi investigado durante aproximadamente 10 horas para que se pudesse evitar uma possível contaminação que interferisse nos resultados de estabilidade do antibiótico. Em cada intervalo de tempo amostras foram retiradas e depois a concentração de AC não degradado foi quantificada por HPLC. O ajuste linear aos dados experimentais utilizados para o cálculo da constante de hidrólise em pH 6,2 cada temperatura pode ser visualizado nas Figuras 6.15(a) para 10-20°C e na Figura 6.15(b) para 30-40°C. A Tabela 6.8 mostra os valores de k obtidos nesses experimentos e o tempo de meia-vida no processo de degradação do AC.3 em pH 6,2.

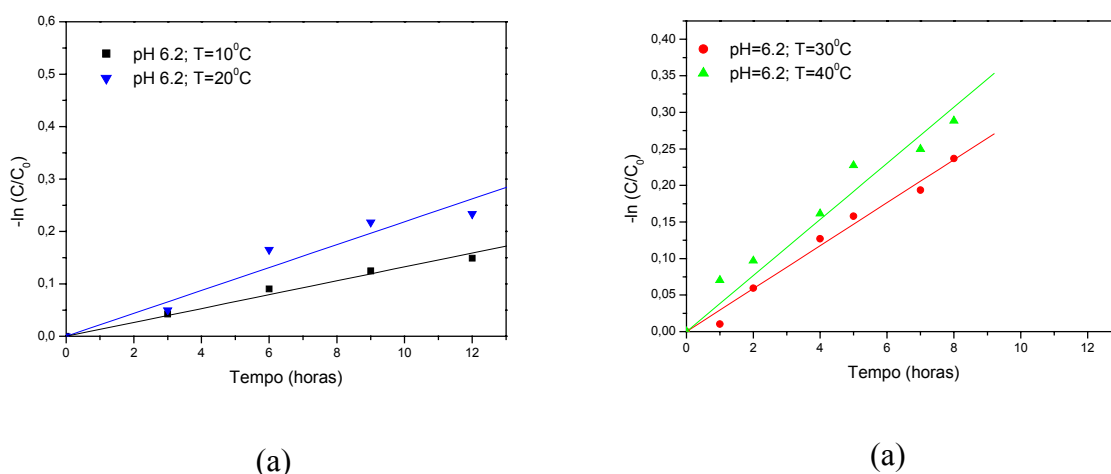


Figura 6.15: Hidrólise de ácido clavulânico (AC.3), em diferentes temperaturas, pH 6.2. (a) 10 e 20°C; (b) 30 e 40°C.

O ajuste linear aos dados experimentais utilizados para o cálculo da constante de hidrólise em pH 7,0 cada temperatura pode ser visualizado nas Figuras 6.16(a) para 10-20°C e na Figura 6.16(b) para 30-40°C. A Tabela 6.9 mostra os valores de k obtidos

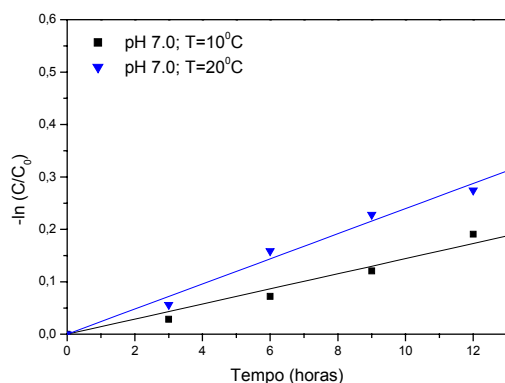
nesses experimentos e o tempo de meia-vida no processo de degradação do AC.3 em pH 7,0.

Tabela 6.8: Constante de degradação e tempo de meia-vida do AC.3 a pH 6,2

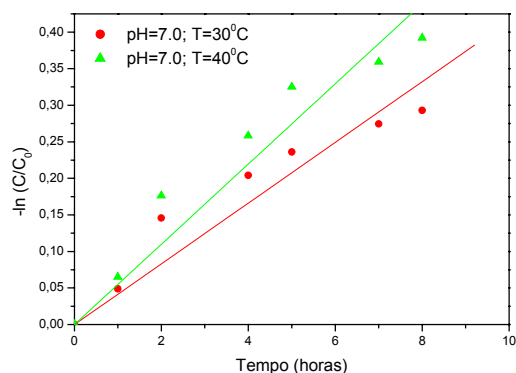
Temperatura (°C)	Constante de hidrólise (h ⁻¹)	Tempo de meia-vida (h)
10 (r ² = 0,993)	0,01324 ± 0,00048	52,3
20 (r ² = 0,969)	0,02186 ± 0,00157	31,7
30 (r ² = 0,993)	0,02940 ± 0,00087	23,6
40 (r ² = 0,984)	0,03838 ± 0,00443	18,1

Tabela 6.9: Constante de degradação e tempo de meia-vida do AC.3 a pH 7,0.

Temperatura (°C)	Constante de hidrólise (h ⁻¹)	Tempo de meia-vida (h)
10 (r ² = 0,987)	0,01443 ± 0,00087	48,0
20 (r ² = 0,992)	0,02397 ± 0,00086	28,9
30 (r ² = 0,964)	0,04152 ± 0,00290	16,7
40 (r ² = 0,971)	0,05490 ± 0,00346	12,6



(a)



(b)

Figura 6.16: Hidrólise do ácido clavulânico (AC.3) em diferentes temperaturas, pH 7,0.

(a) 10 and 20°C; (b) 30 and 40°C.

Para o caso da degradação de ácido clavulânico em meio fermentado pode-se observar pelas Tabelas 6.8 e 6.9 que a constante de degradação também aumenta com o aumento da temperatura, como já se tinha visto para o AC.1 e o AC.2. Comparando-se

as Tabelas 6.6 e 6.8 e as Tabelas 6.7 e 6.9, pode-se notar que as constantes de degradação obtidas nos experimentos com amostras de AC de fermentação foram maiores que aquelas obtidas nos experimentos em solução aquosa tanto em pH 6,2 quanto em pH 7,0. Esse fato pode ser explicado possivelmente pela presença de alguns componentes no meio fermentativo, como compostos de amônia, que aumentam a instabilidade de ácido clavulânico. As diferenças entre as constantes de hidrólise de AC em solução aquosa e em meio fermentativo (AC.3) foram maiores nas temperaturas de 10 e 20°C (2,0 vezes) e diminuiram nas temperaturas mais altas, 30 e 40°C, em ambos pHs.

6.4.3 DEPENDÊNCIA DA CONSTANTE DE HIDRÓLISE COM A TEMPERATURA

Os resultados da constante de hidrólise obtidos tornaram possível estabelecer uma relação entre os valores de k e a variação da temperatura. Essa relação foi obtida utilizando-se a equação de Arrhenius (Equação 48) que relaciona a temperatura com as constantes de reação. Essa relação pode ser vista na Tabela 6.10.

$$k = A \cdot e^{\frac{-E_a}{R \cdot T}} \quad (48)$$

onde:

k = constante de reação (h^{-1})

A = fator de frequência (h^{-1})

E_a = energia de ativação (KJ/mol)

R = constante dos gases (8,314 J/mol.K)

T = temperatura (K)

As relações entre k e a temperatura, mostradas na Tabela 6.10 podem ser usadas para determinar as constantes de hidrólise de ácido clavulânico em outras temperaturas, como foi feito na Tabela 6.6 para o AC.2 a 20°C.

Utilizando-se as equações de Arrhenius da Tabela 6.10 foi possível determinar em qual temperatura (T_E) a constante de degradação de AC é igual nos diferentes pHs.

Essas temperaturas estão apresentadas nas Figuras 6.17(a), 6.17(b) e 6.17 (c) para AC.1, AC.2 e AC.3, respectivamente.

Tabela 6.10: Equações de Arrhenius.

	pH 6,2	pH 7,0
AC.1	$k = 3,684 \cdot 10^6 e^{\left(\frac{-50,474}{R \cdot T}\right)}$	$k = 1,304 \cdot 10^{10} e^{\left(\frac{-69,007}{R \cdot T}\right)}$
AC.2	$k = 3,275 \cdot 10^4 e^{\left(\frac{-39,198}{R \cdot T}\right)}$	$k = 8,408 \cdot 10^7 e^{\left(\frac{-56,478}{R \cdot T}\right)}$
AC.3	$k = 8,061 \cdot 10^2 e^{\left(\frac{-25,795}{R \cdot T}\right)}$	$k = 2,304 \cdot 10^4 e^{\left(\frac{-33,574}{R \cdot T}\right)}$

Na Figura 6.17 observar-se que as temperaturas nas quais o valor de k é igual para os dois pHs são 0°C, -8°C e 5°C para AC.1, AC.2 e AC.3, respectivamente. Pode-se observar também que em temperaturas abaixo desses valores a estabilidade de AC tem comportamento inverso ao já observado, ou seja, a estabilidade é maior a pH 7,0 do que a pH 6,2. Contudo, para se trabalhar nessa faixa de temperatura, no caso do AC.1 e AC.2, é necessária a utilização de soluções congeladas de ácido clavulânico se tornando inadequado para os processos de produção e separação desse antibiótico. Para o caso do AC.3 é possível se trabalhar a 5°C em pH 7,0, porém seria necessário avaliar as vantagens para os processos de separação, pois os custos com refrigeração seriam bastante altos.

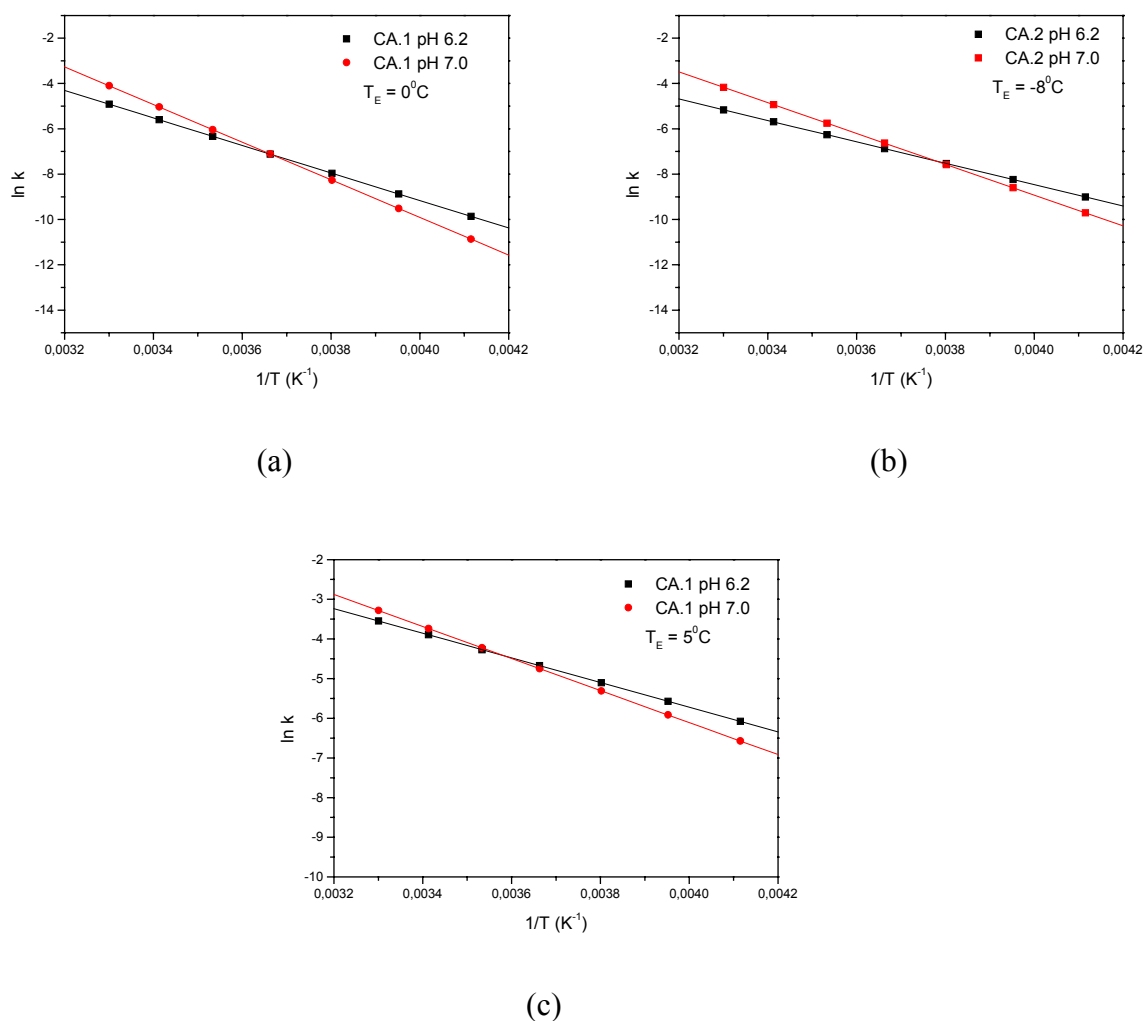


Figura 6.17: Temperaturas nas quais os valores de k são iguais em ambos pHs. (a) AC.1, $T_E = 0^\circ C$; (b) AC.2, $T_E = -8^\circ C$; (c) AC.3, $T_E = 5^\circ C$.

6.5 CINÉTICAS DE ADSORÇÃO E DESSORÇÃO DE AMOSTRAS DE AC DE FERMENTAÇÃO

Foram feitos testes para o estudo cinético de adsorção de AC, proveniente de fermentação, na resina Amberlite IRA 400-Cl. Na realização desses estudos foi verificada a influência da concentração inicial de AC, da temperatura e do pH.

6.5.1 INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO INICIAL

O ensaio EB-31 e EB-34 foram realizados nas mesmas condições de temperatura e pH do ensaio EB-29 na etapa de adsorção, porém a concentração inicial da solução de

AC foi cerca de 9 e 13 vezes maior, respectivamente, que a concentração inicial do ensaio EB-29. As condições de temperatura, pH e concentração inicial desses ensaios estão mostradas na Tabela 6.11 e a comparação entre esses dois ensaios encontra-se na Figura 6.18. Para obter essas concentrações dos ensaios EB-31 e EB-34 foi necessário adicionar AC puro (AC.1) ao meio de fermentação (Almeida et al., 2002).

Tabela 6.11: Condições de pH, temperatura e concentração inicial para o estudo da influência da concentração inicial de AC na etapa de adsorção.

Ensaio	PH	Temperatura	Concentração inicial
EB-29	6,2	10°C	105,1 mg/L
EB-31	6,2	10°C	937,0 mg/L
EB-34	6,2	10°C	1420,0 mg/L

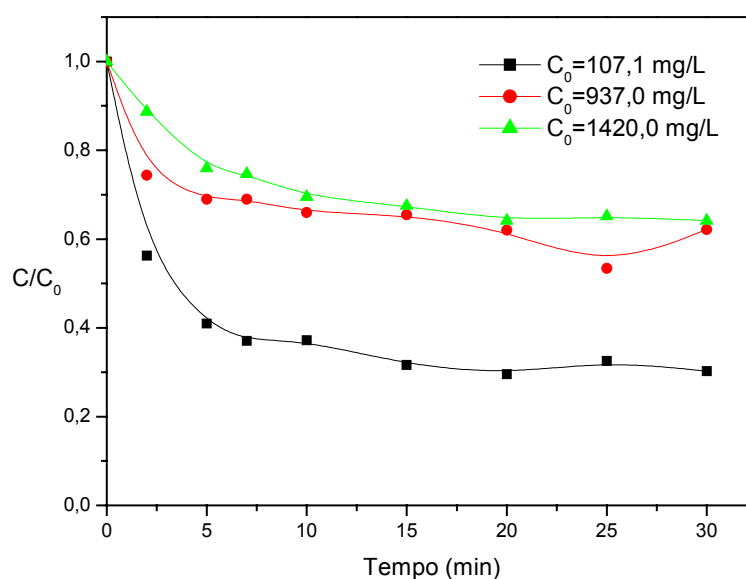


Figura 6.18: Ensaio de adsorção em batelada de ácido clavulânico na resina IRA 400-Cl. Comparação de diferentes concentrações iniciais de AC.3.

Observa-se na Figura 6.18 que no ensaio EB-29 70% do AC presente em solução foi adsorvido pela resina em cerca de 5 minutos, diferentemente do que aconteceu utilizando-se AC puro (Figura 6.6), onde, nessa concentração, todo AC presente em solução foi adsorvido pela resina nesse mesmo tempo de processo. Esse

fato sugere que vários componentes presentes no meio de fermentação competem com o AC e são também, possivelmente, adsorvidos pela resina. Comparando-se o ensaio EB-29 com os ensaios EB-31 e EB-34 viu-se que nestes dois últimos ensaios apenas 40% de AC em solução foi adsorvido. Esse fato mostra que, como já era esperado, a capacidade máxima de adsorção da resina é influenciada pela concentração do produto, uma vez que se trata de uma propriedade física da resina. O valor da capacidade máxima de adsorção da resina foi definido através da obtenção da isoterma de equilíbrio a esta temperatura (10°C) e pH (6,2). Nos três ensaios o equilíbrio é atingido praticamente nos mesmos cinco minutos dos ensaios com o AC puro.

6.5.2 INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA

A influência da temperatura no processo de adsorção em batelada de ácido clavulânico, proveniente do meio fermentado, na resina IRA 400-Cl foi estudada apenas na etapa de adsorção. Foram feitos três ensaios em diferentes temperaturas de adsorção para verificar se a influência da temperatura é a mesma do meio utilizando-se AC puro. As condições de temperatura, pH e concentração inicial desses ensaios estão descritas na Tabela 6.12. Os resultados experimentais obtidos para esses ensaios estão apresentados na Figura 6.19 (Almeida et al., 2002).

Tabela 6.12: Condições de pH, temperatura e concentração inicial para o estudo da influência da temperatura de AC.3 na etapa de adsorção.

Ensaio	pH	Temperatura	Concentração inicial
EB-29	6,2	10°C	105,1 mg/L
EB-33	6,2	20°C	116,2 mg/L
EB-42	6,2	30°C	104,2 mg/L

Analisando-se a Figura 6.19 pode-se observar que existe uma pequena influência da temperatura no processo de troca iônica de AC.3 na resina IRA 400-Cl. Nesse caso, na temperatura de 30°C, a adsorção foi um pouco maior que em 20°C e 10°C. No entanto, à medida que se aumenta a temperatura aumenta-se a degradação do AC, porém, como o tempo de ensaio é pequeno pode-se considerar a degradação desprezível. Em processos mais longos esse efeito deve ser melhor analisado.

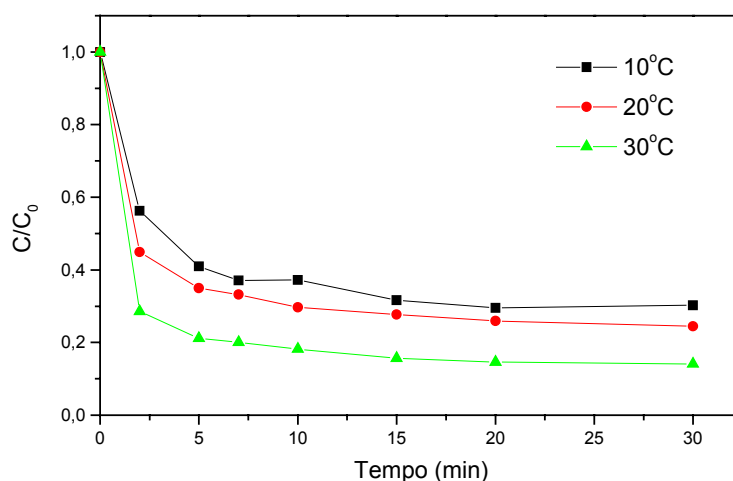


Figura 6.19: Ensaio de adsorção em batelada em tanque agitado de ácido clavulânico (AC.3) na resina IRA 400-Cl. Comparação de diferentes temperaturas na etapa de adsorção.

6.5.3 INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DE ELUENTE

A influência da concentração de eluente na etapa de adsorção foi verificada para o AC puro no item 6.2.4(A) apenas na temperatura de 10°C e pH de 6,2. Porém, para realizar um estudo mais completo e obter as relações entre as constantes cinéticas e de equilíbrio e a concentração salina (NaCl) na etapa de adsorção do processo, foram realizados ensaios em três diferentes temperaturas e concentração de solução de NaCl para verificar a influência desse fator utilizando-se AC proveniente de fermentação. As condições de temperatura, pH, concentração inicial e concentração de solução de NaCl desses ensaios estão descritas na Tabela 6.13. O pH foi mantido constante em 6,2, pois é uma variável que influencia muito na degradação do antibiótico. Os resultados experimentais obtidos para esses ensaios estão apresentados nas Figuras 6.20, 6.21 e 6.22 para 10, 20 e 30°C, respectivamente.

Tabela 6.13: Condições de pH, temperatura, concentração inicial e concentração salina para o estudo da influência da concentração de solução de NaCl etapa de adsorção de AC.3.

Ensaio	pH	Temperatura	Concentração inicial	Concentração de NaCl
EB-29	6,2	10°C	105,1 mg/L	0 %
EB-40	6,2	10°C	103,1 mg/L	0,1 %
EB-41	6,2	10°C	111,9 mg/L	1 %
EB-33	6,2	20°C	116,2 mg/L	0%
EB-39	6,2	20°C	118,4 mg/L	0,1 %
EB-35	6,2	20°C	118,4 mg/L	1 %
EB-42	6,2	30°C	104,2 mg/L	0 %
EB-38	6,2	30°C	121,8 mg/L	0,1 %
EB-37	6,2	30°C	106,6 mg/L	1 %

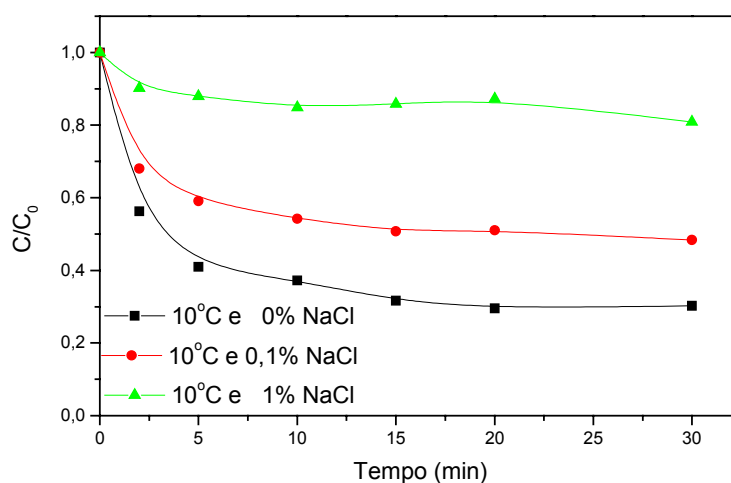


Figura 6.20: Ensaio de adsorção em batelada em tanque agitado de ácido clavulânico (AC.3) na resina IRA 400-Cl. Comparação de diferentes concentrações de solução de NaCl na etapa de adsorção a 10°C.

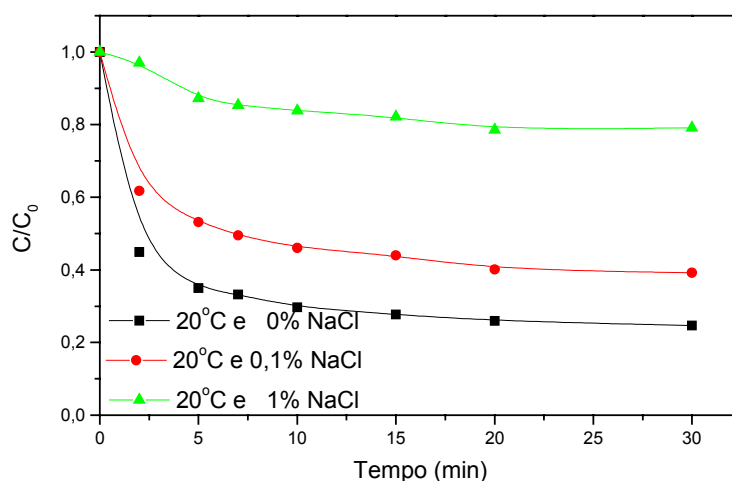


Figura 6.21: Ensaio de adsorção em batelada em tanque agitado de ácido clavulânico (AC.3) na resina IRA 400-Cl. Comparação de diferentes concentrações de solução de NaCl na etapa de adsorção a 20°C.

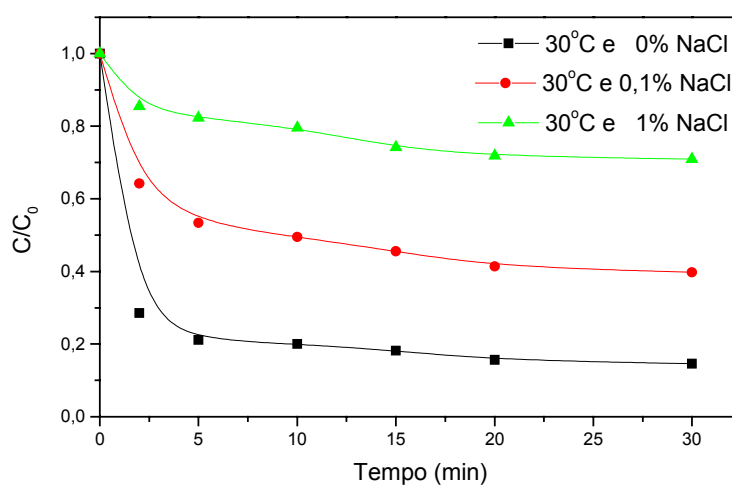


Figura 6.22: Ensaio de adsorção em batelada em tanque agitado de ácido clavulânico (AC.3) na resina IRA 400-Cl. Comparação de diferentes concentrações de solução de NaCl na etapa de adsorção a 30°C.

As Figuras 6.20, 6.21 e 6.22 mostram que a presença de apenas 1% (p/v) de solução de NaCl na etapa de adsorção é bastante prejudicial para o processo de adsorção de AC na resina IRA 400-Cl acarretando na adsorção de apenas 10% a 20% de AC

presente em solução, dependendo da temperatura. Quando a concentração de solução de NaCl presente na adsorção é de 0,1%, ou seja, 10 vezes menor do que as dos ensaios com 1% (p/v) de solução de NaCl, a adsorção é de aproximadamente 50% do ácido clavulânico presente em solução. Com esses resultados, juntamente com as isotermas de equilíbrio, pode-se fazer um estudo da influência da concentração salina nas constantes cinéticas e de equilíbrio através da utilização do modelo matemático descrito no item 5.1.

6.5.4 INFLUÊNCIA DO pH

A influência do pH no processo de adsorção em batelada de ácido clavulânico não foi verificada para o AC puro. Portanto, foram realizados 2 ensaios em diferentes pHs para verificar a influência desse fator utilizando-se AC proveniente de fermentação na etapa de adsorção. As condições de temperatura, pH e concentração inicial desses ensaios estão descritas na Tabela 6.14. Os resultados experimentais obtidos para esses ensaios estão representados na Figura 6.23 (Almeida et al., 2002).

Tabela 6.14: Condições de pH, temperatura e concentração inicial para o estudo da influência do pH na etapa de adsorção de AC.3.

Ensaio	PH	Temperatura	Concentração inicial
EB-29	6,2	10°C	105,1mg/L
EB-32	4,0	10°C	121,2 mg/L

Pelos resultados apresentados na Figura 6.23 pode-se observar que não há influência do pH no processo de troca iônica de AC.3 na resina IRA 400-Cl na etapa de adsorção, nesta faixa estudada. Optou-se por manter o pH em torno de 6,0 para manter uma maior estabilidade do AC tanto na etapa de adsorção quanto na etapa de dessorção.

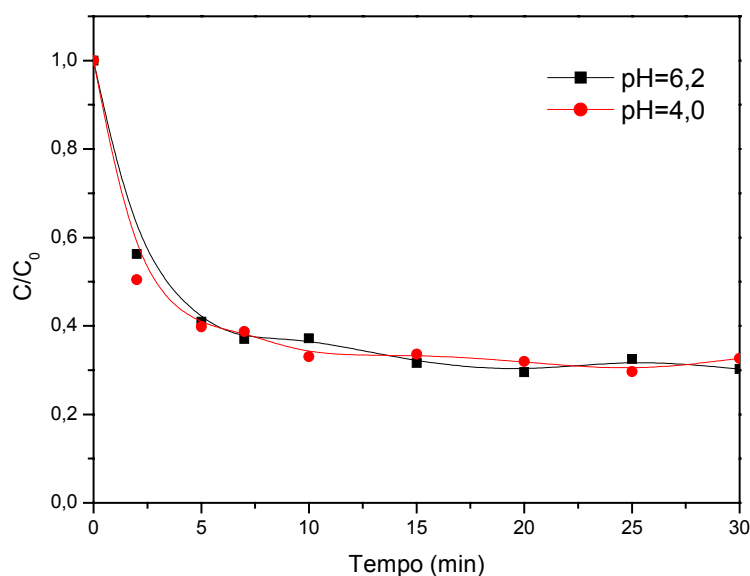


Figura 6.23: Ensaio de adsorção em batelada de ácido clavulânico (AC.3) na resina IRA 400-Cl. Comparação de diferentes pHs na etapa de adsorção.

6.6 ISOTERMAS DE ADSORÇÃO DE AMOSTRAS DE AC DE FERMENTAÇÃO

6.6.1 INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA

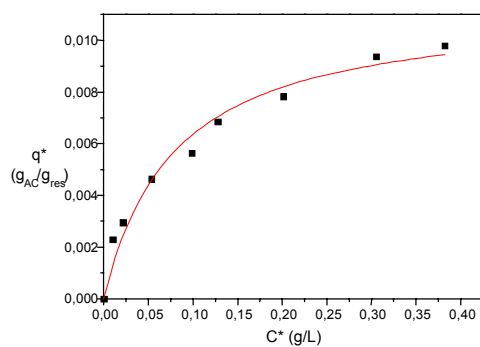
Foram obtidas isotermas de adsorção de ácido clavulânico, proveniente da fermentação, em resina de troca iônica IRA 400 no ciclo cloreto em três diferentes temperaturas para verificar a influência deste fator no equilíbrio de adsorção. Em todos os ensaios o pH foi mantido em 6,2. Os resultados obtidos desses ensaios estão mostrados na Figura 6.24. Para realizar a regressão não-linear dos dados experimentais utilizou-se o modelo de Langmuir (Equação 1) para representar matematicamente esses dados de equilíbrio. Os termos q_m , máxima capacidade de adsorção, e K_D , que é a constante de equilíbrio, estão apresentados na Tabela 6.15.

Observando-se os resultados da Tabela 6.15 pode-se concluir que a capacidade máxima da resina não é alterada com a mudança de temperatura como já era esperado pelos resultados da literatura. As constantes de equilíbrio são um pouco diferentes.

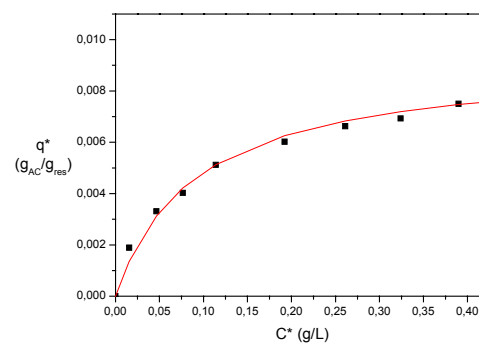
Observa-se porém, que, pelos erros obtidos, não existe muita variação de K_D com a temperatura dentro da faixa estudada.

Tabela 6.15: Parâmetros da isoterma de equilíbrio segundo modelo de Langmuir para diferentes temperaturas.

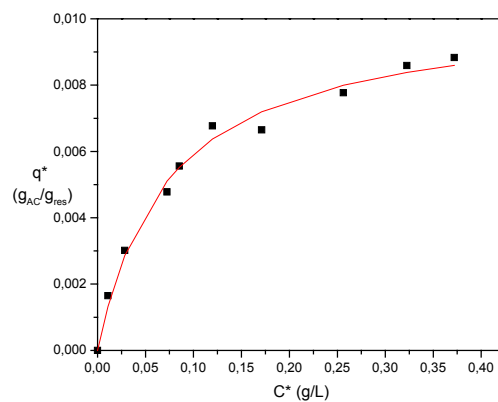
Temperatura (°C)	$q_m \cdot 10^2$ (g _{AC} /g _{res})	$K_D \cdot 10^2$ (g/L)
10	1,14±0,06	7,91±0,39
20	0,92±0,05	9,06±0,45
30	1,03±0,05	7,38±0,37



(a)



(b)



(c)

Figura 6.24: Regressão não-linear dos dados experimentais das isotermas de adsorção de AC.3 na resina IRA 400-Cl. (a) $T=10^\circ\text{C}$ ($r^2=0,976$); (b) $T=20^\circ\text{C}$ ($r^2=0,987$); $T=30^\circ\text{C}$ ($r^2=0,989$).

6.6.2 INFLUÊNCIA DO pH

Foram obtidas isotermas de adsorção de ácido clavulânico, proveniente da fermentação, em resina de troca iônica IRA 400 no ciclo cloreto em dois diferentes pHs (6,2 e 4,0) para verificar a influência deste fator no equilíbrio de adsorção. Os ensaios foram realizados nesses dois pHs (6,2 e 4,0) e a temperatura foi mantida a 10, 20 e 30°C. Os resultados obtidos nesses ensaios estão mostrados nas Figuras 6.25, 6.26 e 6.27 para 10, 20 e 30°C, respectivamente.

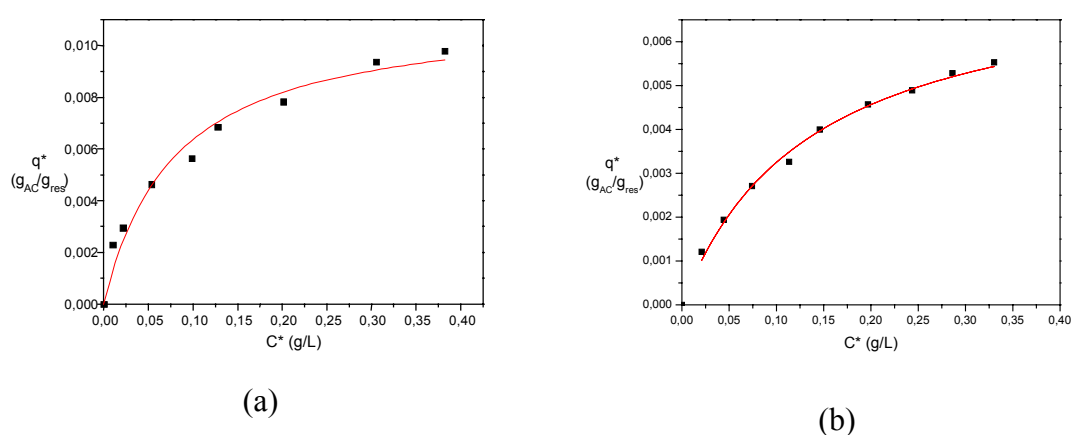


Figura 6.25: Regressão não-linear dos dados experimentais das isotermas de adsorção de AC.3 na resina IRA 400-Cl na temperatura de 10°C. (a) pH=6,2 ($r^2=0,976$); (b) pH=4,0 ($r^2=0,996$).

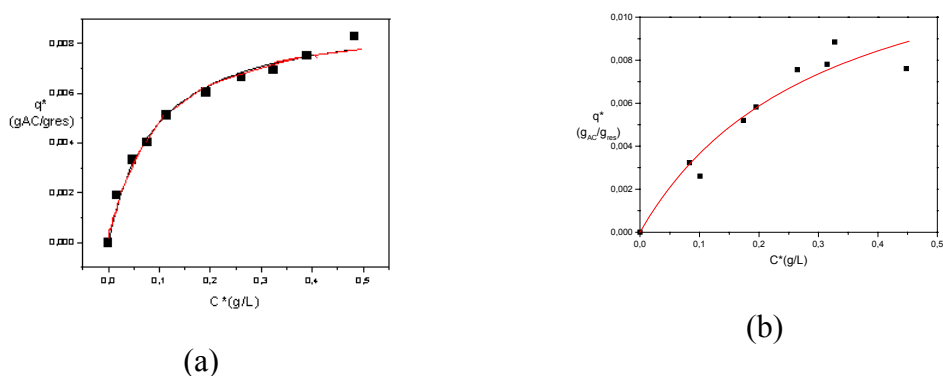


Figura 6.26: Regressão não-linear dos dados experimentais das isotermas de adsorção de AC.3 na resina IRA 400-Cl na temperatura de 20°C. (a) pH=6,2 ($r^2=0,987$); (b) pH=4,0 ($r^2=0,933$).

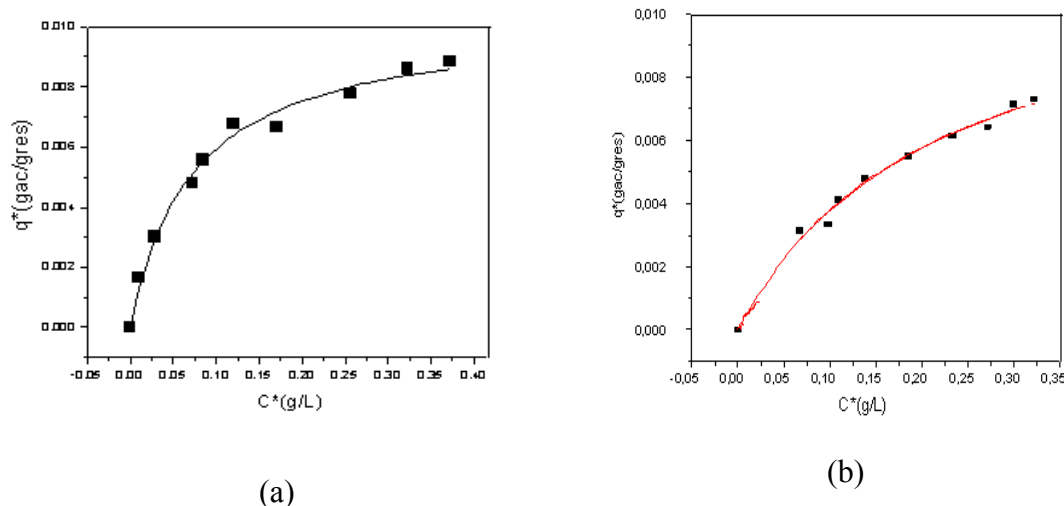


Figura 6.27: Regressão não-linear dos dados experimentais das isotermas de adsorção de AC.3 na resina IRA 400-Cl na temperatura de 30°C. (a) pH=6,2 ($r^2=0,989$); (b) pH=4,0 ($r^2=0,991$).

Para realizar a regressão não-linear dos dados experimentais utilizou-se o modelo de Langmuir (Equação 1) para representar matematicamente esses dados de equilíbrio. Os termos q_m , máxima capacidade de adsorção, e K_D , que é a constante de equilíbrio, estão apresentados na Tabela 6.16.

Tabela 6.16: Parâmetros da isoterma de equilíbrio segundo modelo de Langmuir para diferentes pHs.

pH	Temperatura (°C)	$q_m \cdot 10^2$ (g _{AC} /g _{res})	$K_D \cdot 10^2$ (g/L)
6,2	10	1,14±0,06	7,91±0,39
4,0	10	0,76±0,04	13,64±0,68
6,2	20	0,92±0,05	9,09±0,45
4,0	20	1,49±0,07	30,95±1,55
6,2	30	1,03±0,05	7,39±0,37
4,0	30	1,20±0,06	21,70±1,08

Os dados de equilíbrio mostram que a capacidade máxima da resina foi menor quando utilizou-se pH 4,0 e temperatura 10°C, porém o mesmo fato não se repetiu nas outras duas temperaturas. Analisando-se os valores K_D pode-se afirmar que a diminuição do pH de 6,2 para 4,0 prejudica o processo de adsorção, independentemente

da temperatura de adsorção. Portanto, observando-se os dados das isotermas em diferentes pHs e temperaturas, conclui-se que no processo de adsorção do AC na resina Amberlite IRA 400-Cl não é vantajoso diminuir o pH, ou aumentar a temperatura, pois tanto prejudica a adsorção como aumenta a instabilidade do antibiótico.

6.6.3 INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DE ELUENTE

Foram obtidas isotermas de adsorção de ácido clavulânico, proveniente da fermentação, em resina de troca iônica IRA 400 no ciclo cloreto em diferentes concentrações salinas em pH 6,2 e três diferentes temperaturas (10, 20 e 30°C), para verificar a influência deste fator no equilíbrio de adsorção. Para realizar a regressão não-linear dos dados experimentais também foi utilizado o modelo de Langmuir (Equação 1) para representar matematicamente esses dados de equilíbrio. Os termos q_m , máxima capacidade de adsorção, e K_D , que é a constante de equilíbrio, estão apresentados na Tabela 6.17.

Tabela 6.17: Parâmetros da isoterma de equilíbrio segundo modelo de Langmuir para diferentes temperaturas.

Temperatura (°C)	Concentração de NaCl	$q_m \cdot 10^2$ (g _{AC} /g _{res})	$K_D \cdot 10^2$ (g/L)
10 ($r^2=0,976$)	0%	1,14±0,06	7,91±0,39
10 ($r^2 = 0,993$)	0,1%	1,23±0,06	19,03±0,95
10 ($r^2 = 0,795$)	1%	1,13±0,06	47,99±2,40
20 ($r^2=0,987$)	0%	0,92±0,05	9,09±0,45
20 ($r^2=0,955$)	0,1%	1,34±0,07	18,90±0,94
20 ($r^2=$)	1%	—	—
30 ($r^2=0,989$)	0%	1,03±0,05	7,38±0,37
30 ($r^2=0,993$)	0,1%	1,36±0,07	36,11±1,80
30 ($r^2=0,895$)	1%	0,69±0,02	42,48±2,12

Analisando-se os dados da Tabela 6.17 pode-se notar a grande diferença entre a constante de equilíbrio com e sem a presença de solução de NaCl no processo em todas as temperaturas analisadas. Como já era esperado a adsorção é desfavorecida na

presença de solução de NaCl, uma vez que este é o eluente utilizado para dessorção. Na presença de 1% (p/v) de solução de NaCl os ajustes não foram bons, pois a solução de NaCl interfere muito na adsorção e os dados experimentais não ficaram satisfatórios, principalmente a 20°C. Optou-se por não colocar os dados de equilíbrio nessa temperatura com solução de NaCl 1%.

6.7 MODELAGEM E SIMULAÇÃO DO PROCESSO EM BATELADA

Neste item tem-se a apresentação dos resultados obtidos para simulação do processo de adsorção do ácido clavulânico na resina Amberlite IRA 400-Cl em batelada em tanque agitado. Com o conhecimento das isothermas e dos dados experimentais de adsorção em tanque agitado, foi possível, através do modelo matemático proposto, obter valores dos parâmetros cinéticos intrínsecos (k_1 e k_2) e parâmetros de transporte como difusividade efetiva (D_{ef}) e coeficiente de resistência do filme líquido (k_s), para diferentes temperaturas e concentração inicial de amostras de AC puro e fermentado.

6.7.1 AMOSTRAS DE AC PURO – DIFERENTES TEMPERATURAS

Os parâmetros de transporte tais como difusividade efetiva e coeficiente de resistência do filme líquido e os parâmetros cinéticos relacionados com a constante de equilíbrio foram obtidos pelas simulações do processo de adsorção do AC.1 na resina IRA 400-Cl em diferentes temperaturas. A Figura 6.28 mostra o ajuste do modelo proposto aos dados experimentais para ensaios de adsorção em quatro diferentes temperaturas (5, 10, 23 e 30°C). Observando-se a Figura 6.28 pode-se verificar que o modelo proposto apresentou um bom ajuste com relação aos resultados experimentais (Barboza et al., 2003).

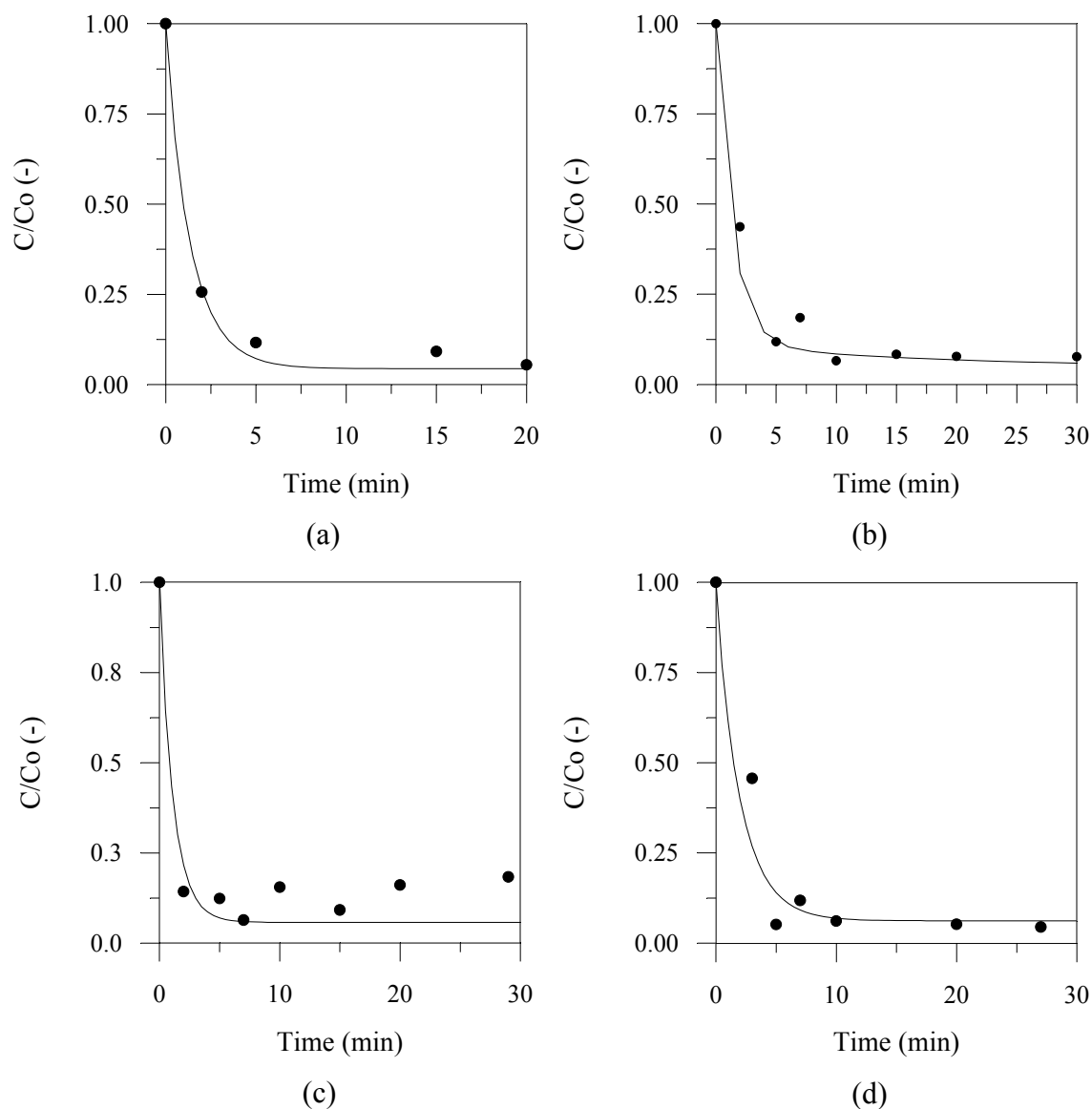


Figura 6.28: Curva cinética de adsorção de AC.1 na resina IRA 400-Cl. Dados experimentais e ajuste pelo modelo proposto. (a) 5°C; (b) 10°C; (c) 23°C; (d) 30°C. (Barboza et al., 2003).

Tabela 6.18: Parâmetros cinéticos e de transporte para adsorção de AC.1 em tanque agitado. (Barboza et al., 2003).

T °C	$C_0 \cdot 10^3$ g/L	$D_{ef} \cdot 10^5$ cm^2/s	$k_s \cdot 10^2$ cm/s	Bi -	$v_{obs} \cdot 10^{-4}$ $g L^{-1} s^{-1}$	$\phi_{obs} (-)$	k_1 Lg^{-1} min^{-1}	$k_2 \cdot 10^{-2}$ min^{-1}	$K_D \cdot 10^2$ g/L
5	108,1	2,10	1,51	35,7	1,07	0,91	1,32	4,15	3,14
10	98,0	2,34	1,42	29,9	2,17	1,42	1,10	4,33	3,94
23	104,4	2,70	2,05	37,9	0,98	1,30	0,80	5,80	7,22
30	89,0	3,40	3,00	45,6	0,84	1,53	0,60	5,20	8,63

Os resultados da Tabela 6.18 mostraram que o processo é limitado tanto pela etapa de adsorção quanto pela transferência de massa pois φ_{obs} está entre 0,91 e 1,53, indicando que nenhum dos dois fatores pode ser desprezado (Bailey e Ollis, 1986). É importante salientar que a literatura não considera o efeito da cinética de adsorção, pois baseia-se em resultados obtidos para produtos de alto peso molecular (proteínas). Porém, no presente trabalho, evidenciou-se que, no caso de substâncias de baixo peso molecular, a cinética de adsorção intrínseca deve ser considerada.

Ainda na Tabela 6.18 observa-se que os parâmetros de transporte são influenciados pela mudança de temperatura. O parâmetro cinético k_1 , porém, mostrou a maior sensibilidade devido à variação de temperatura, um resultado já esperado em vista da variação da constante de equilíbrio com a temperatura. O parâmetro k_1 é menor em altas temperaturas, provavelmente pois o estado de agitação das moléculas aumenta e a dessorção é favorecida.

Após a etapa de adsorção o ácido clavulânico foi eluído utilizando-se 10% (p/v) de solução de NaCl. A Figura 6.29 ilustra os resultados experimentais e simulados obtidos em 5 ensaios realizados em três diferentes temperaturas (10, 25 e 30°C).

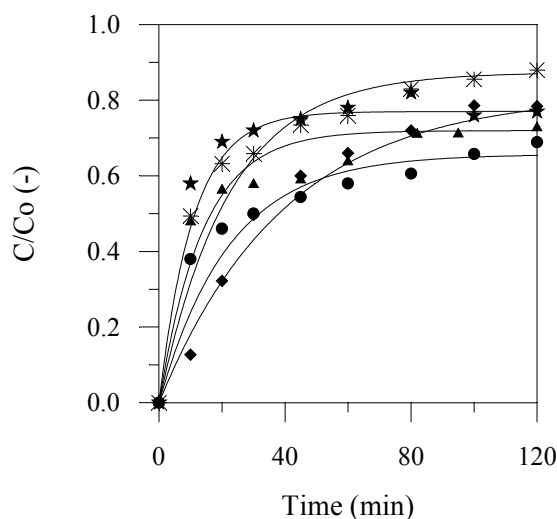


Figura 6.29: Dados experimentais e simulados da dessorção de AC.1 na resina Amberlite IRA 400-Cl com solução de NaCl 10% (p/v). $C_0=●92,8$ mg/L; $C_0=■961,3$ mg/L; $C_0=▲118,0$ mg/L; $C_0=∗103,0$ mg/L; $C_0=★98,0$ mg/L. (Barboza et al., 2003).

Assim como na etapa de adsorção, a Figura 6.29 mostra o bom ajuste do modelo aos dados experimentais na etapa de dessorção do ácido clavulânico. Os resultados da eluição foram utilizados para determinar o parâmetro cinético k_3 , o coeficiente de

difusão, k_s , e a difusividade efetiva, D_{ef} . Os parâmetros ajustados pelo modelo estão mostrados na Tabela 6.19 (Barboza et al., 2003).

Tabela 6.19: Parâmetros cinéticos e de transporte da etapa de dessorção do AC.1 em tanque agitado (Barboza et al., 2003)..

Ensaio	T(°C)	$C_0 \cdot 10^3$ (g/L)	$D_{ef} \cdot 10^5$ (cm ² /s)	$k_s \cdot 10^2$ (cm/s)	$k_3 \cdot 10^2$ [min ⁻¹].	Bi(-)
1	10	92,8	2,34	2,21	4,90	47,2
2	30	98,0	3,40	2,58	9,70	37,9
3	30	103,0	3,40	2,14	9,70	31,5
4	25	118,0	2,51	2,58	8,49	51,4
5	25	961,3	2,51	1,95	3,18	38,8

Observando-se os valores da constante k_3 da Tabela 6.19 verifica-se que o encontrado no quinto experimento foi mais baixo do que o esperado, contudo, isso pode ser devido à alta concentração inicial de AC.1 presente em solução. Pode-se verificar que essa constante também apresentou sensibilidade com a variação de temperatura. Portanto, foi também associada a temperatura pela equação de Arrhenius, mostrando que o processo de dessorção pode ser facilitado pelo aumento da temperatura, como já foi discutido antes, pois o aumento do estado de agitação das moléculas permite que as moléculas de AC sejam mais facilmente removidas dos sítios da resina. A Figura 6.30 mostra a variação de k_3 com a temperatura. Para a constante cinética de dessorção k_3 será possível prever valores, para diferentes temperaturas, utilizando-se a equação de Arrhenius.

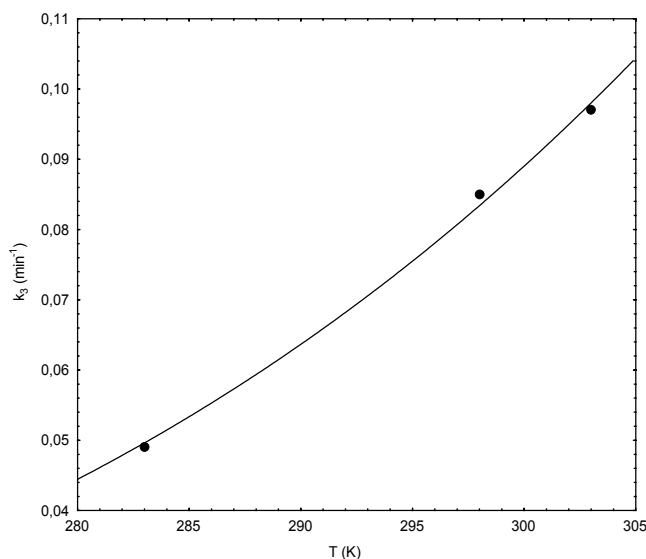


Figura 6.30: Comportamento de k_3 com a temperatura. Equação de Arrhenius ajustada aos dados experimentais. Fator de frequência: $A=1492,31 \text{ min}^{-1}$; Energia de ativação: $E_a=24,26 \text{ KJ.mol}^{-1}$; ($r^2=0,997$). (Barboza et al., 2003).

6.7.2 AMOSTRAS DE AC PURO – DIFERENTES CONCENTRAÇÕES INICIAIS

Depois de avaliada a influência da temperatura nas constantes cinéticas de adsorção e dessorção, o propósito desses experimentos foi avaliar a capacidade da resina Amberlite IRA 400-Cl de extrair o ácido clavulânico. Essa avaliação foi feita analisando-se os resultados obtidos pelo modelo matemático em diferentes concentrações iniciais de AC.1. Todos os ensaios foram realizados a 10°C e pH 7,0 (Barboza et al., 2002b).

A difusividade efetiva (D_{ef}) e o coeficiente de difusão no filme líquido (k_s) foram obtidos pela otimização do modelo utilizando o método dos mínimos quadrados. Os valores obtidos estão apresentados na Tabela 6.20. Com base nos valores da difusividade efetiva, a adsorção específica (v_{obs}) e também o módulo de Thiele observado (ϕ_{obs}) puderam ser calculados do mesmo modo do item anterior.

Os resultados da Tabela 6.20, mostram que os valores de ϕ_{obs} variam entre 0,58 e 2,17. Geralmente valores de $\phi_{obs} < 0,3$ indicam limitação pela etapa de adsorção e $\phi_{obs} > 3,0$ limitação por transferência de massa (Bailey e Ollis, 1986). Os valores encontrados indicam, como já foi comentado, que as duas etapas devem ser consideradas. A resistência à transferência de massa através do filme da camada limite

das partículas esféricas da resina foi desprezível, um fenômeno que está refletido pelos altos valores de Biot obtidos no processo. Observando ainda os dados da Tabela 6.20 vê-se que a concentração inicial de AC parece afetar os valores de D_{ef} . O mesmo fato foi observado por Mayer et al. (1997). Provavelmente o núcleo inerte nas partículas, cujo tamanho depende da concentração externa, afeta a razão R^2/D_{ef} que aparece no modelo. A Figura 6.33 mostra comparações entre os dados experimentais e os valores simulados do processo de adsorção do AC.1, para cada ensaio.

Tabela 6.20: Parâmetros de transporte da adsorção de AC.1 em tanque agitado, $T = 10^\circ\text{C}$, $q_m = 2,28 \cdot 10^{-2} \text{ g}_{CA}/\text{g}_{res}$; $K_D = 3,94 \cdot 10^{-2} \text{ g/L}$. $R_p = 0,50 \text{ mm}$ (Barboza et al., 2002b).

Ensaio	$C_0 \cdot 10^3 \text{ (g/L}^{-1}\text{)}$	$D_{ef} \cdot 10^5 \text{ (cm}^2\text{s}^{-1}\text{)}$	$k_s \cdot 10^2 \text{ (cms}^{-1}\text{)}$	Bi(-)	$v_{obs} \cdot 10^2 \text{ (g/L}^{-1}\text{s}^{-1}\text{)}$	$\phi_{obs} \text{ (-)}$
1	92,8	6,50	6,40	49,2	2,26	0,58
2	98,0	2,34	1,42	29,9	2,17	1,42
3	103,0	2,34	1,42	29,9	1,51	1,74
4	117,9	2,40	2,40	50,0	2,21	2,17
5	961,3	3,15	3,10	49,1	7,20	0,66

Da Figura 6.31 pode-se dizer que o primeiro ajuste foi feito considerando o balanço na superfície da resina (Equação 14), essa consideração permitiu a determinação dos parâmetros de transporte D_{ef} and k_s . Depois que esses parâmetros foram obtidos, as Equações 8 e 13 foram utilizadas para determinar os parâmetros cinéticos intrínsecos (k_1 e k_2). A Tabela 6.21 mostra os resultados desses últimos parâmetros. Os resultados da Tabela 6.20 mostram que as etapas de adsorção e de transferência de massa limitam o processo. O modelo cinético puramente intrínseco (Equação 8), ou seja, que não leva em consideração a difusividade efetiva, foi avaliado e as constantes cinéticas intrínsecas (k'_1 e k'_2) foram obtidas e estão apresentadas na Tabela 6.21. Essas constantes foram comparadas com as do modelo que considera a difusividade (Equações 8 e 13). Os valores de k'_1 (modelo puramente intrínseco) foram menores que os de k_1 obtidos do ajuste das Equações 8 e 13 (modelo intrínseco-difusivo).

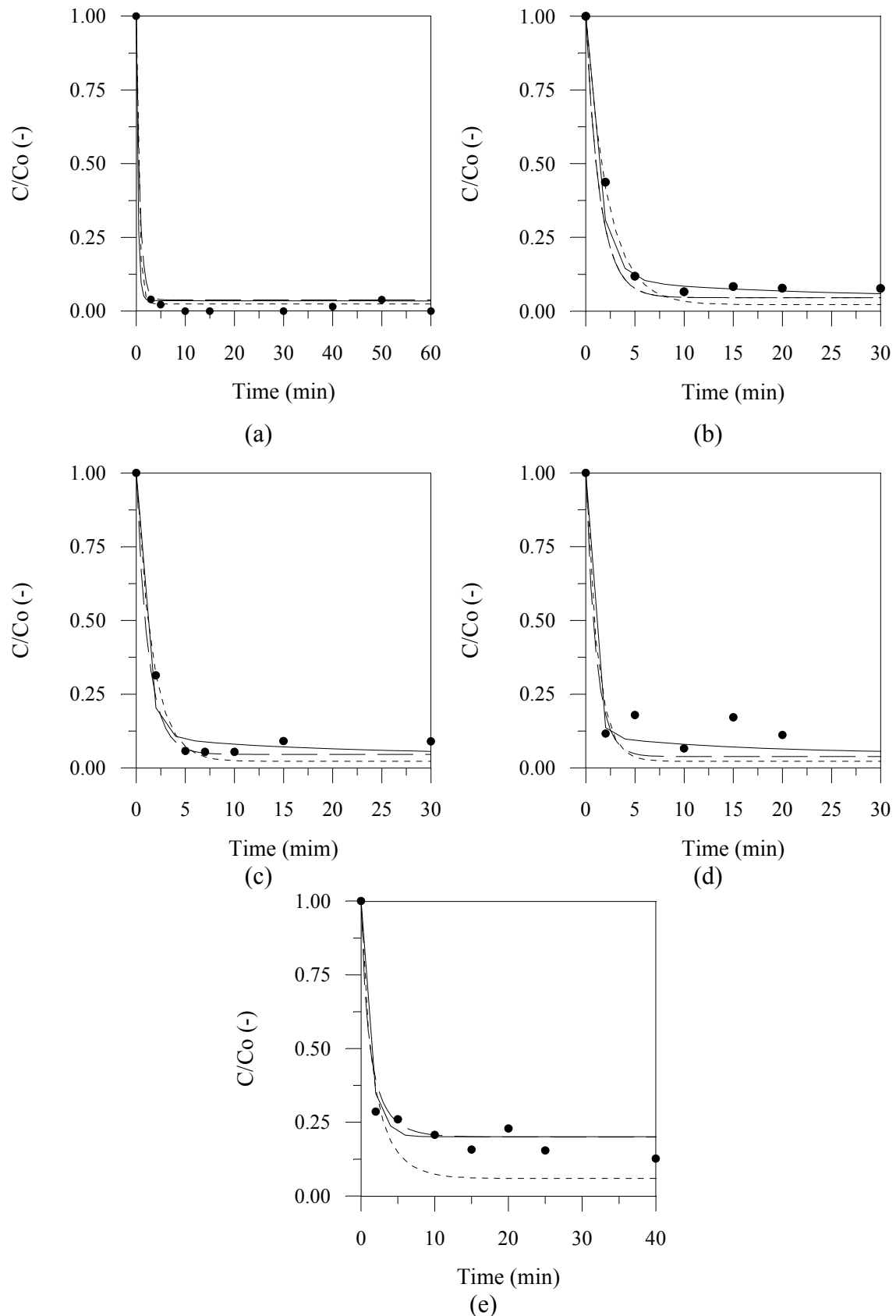


Figura 6.31: Dados experimentais e simulados da cinética de adsorção de AC.1 na resina IRA 400-Cl. Linha contínua ajustada pela Equação 14, linha pontilhada ajustada pela Equação 8 (modelo puramente intrínseco), linha tracejada ajustada pelas Equações 8 e 13. (a) Ensaio 1; (b) Ensaio 2; (c) Ensaio 3; (d) Ensaio 4; (e) Ensaio 5. (Barboza et al., 2002b).

Com base nos dados experimentais e na Equação A.9 (Apêndice A), foi possível determinar k_R (Tabela 6.21) e, assim, estimar o valor de k_1 na Equação A.7 (Apêndice A). Os resultados revelam que os valores de k_1 obtidos pela Equação A.9 são menores que aqueles obtidos considerando o modelo intrínseco-difusivo das Equações 8 e 13. Esse fato enfatiza a consideração que a cinética de reação e a limitação por transferência de massa devem ser consideradas.

Tabela 6.21: Parâmetros intrínsecos obtidos com ajuste não-linear (Barboza et al., 2002b).

Ensaio	k_1 ($\text{Lg}^{-1}\text{min}^{-1}$)	k_2 (min^{-1})	k'_1 ($\text{Lg}^{-1}\text{min}^{-1}$)	k'_2 (min^{-1})	k_R (min^{-1})	k_1 ($\text{Lg}^{-1}\text{min}^{-1}$) (da Eq. A.9)
1	1,10	0,043	0,89	0,035	1,34	1,27
2	1,10	0,043	0,24	0,010	0,64	0,61
3	1,10	0,043	0,32	0,013	0,70	0,68
4	1,13	0,045	0,46	0,018	0,99	0,95
5	1,13	0,045	0,46	0,018	0,94	0,91

O módulo de Thiele (ϕ) pode ser calculado utilizando-se os valores de k_R da Tabela 6.21 pela Equação 51 e o fator de efetividade pode ser calculado utilizando-se o módulo de Thiele pela Equação 52. Esses valores são mostrados na Tabela 6.22 para cada ensaio.

$$\phi = \frac{R}{3} \sqrt{\frac{k_R}{D_{ef}}} \quad (51)$$

$$\eta = \frac{1}{\phi} \left(\frac{1}{\tanh 3\phi} - \frac{1}{3\phi} \right) \quad (52)$$

Tabela 6.22: Módulo de Thiele e fator de efetividade para cada ensaio (Barboza et al., 2002b).

Ensaio	ϕ (-)	η (-)
1	0,31	0,95
2	0,36	0,93
3	0,37	0,93
4	0,44	0,90
5	0,37	0,93

De acordo com os resultados da Tabela 6.22, como já era esperado, a limitação por transferência de massa e da cinética de adsorção são fatores limitantes a serem considerados na análise desse processo. Deste modo, os parâmetros intrínsecos são altamente representativos no processo estudado.

6.7.3 AMOSTRAS DE AC DE FERMENTAÇÃO

Para o caso do ácido clavulânico obtido por fermentação as simulações dos processos de adsorção e dessorção também foram realizadas com base nos dados de equilíbrio da Tabela 6.15 e 6.16 e os resultados obtidos comparados com os resultados experimentais. A utilização do modelo matemático, assim como para o AC.1, permitiu a obtenção tanto dos parâmetros de transporte tais como difusividade efetiva e coeficiente de filme, como dos parâmetros cinéticos relacionados com a constante de equilíbrio (K_D). A Figura 6.32 mostra a comparação dos dados experimentais e simulados para o processo de adsorção do AC.3 na resina Amberlite IRA 400-Cl (Barboza et al. 2002c).

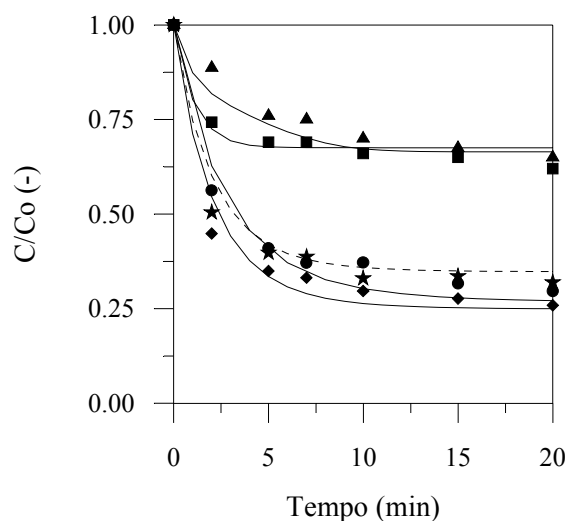


Figura 6.32: Curvas cinéticas para adsorção do ácido clavulânico. Os pontos experimentais são representados por símbolos. Linhas contínuas representam os valores simulados para pH 6,2 e a linha pontilhada para pH 4,0. • EB-29; ■ EB-31; ★ EB-32; ◆ EB-33; ▲ EB-34. (Barboza et al. 2002c).

A Figura 6.32 mostra que o modelo utilizado na simulação do processo de adsorção de AC na resina estudada ajustou-se bem aos dados experimentais em todos os ensaios. Os parâmetros cinéticos e de transporte obtidos na resolução do modelo matemático para etapa de adsorção estão mostrados na Tabela 6.23.

Tabela 6.23: Parâmetros cinéticos e de transporte da adsorção de AC.3 em tanque agitado. (Barboza et al. 2002c)

Ensaio	$C_0 \cdot 10^3$ (gL^{-1})	pH	T ($^{\circ}\text{C}$)	k_1 ($\text{Lg}^{-1}\text{min}^{-1}$)	k_2 (min^{-1})	$D_{\text{ef}} \cdot 10^5$ ($\text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$)	$k_s \cdot 10^2$ ($\text{cm} \cdot \text{s}^{-1}$)
EB-29	105,1	6,2	10	1,70	0,13	9,0	5,3
EB-31	937,0	6,2	10	1,70	0,13	8,7	6,7
EB-32	121,2	4,0	10	1,50	0,20	8,7	4,9
EB-33	116,2	6,2	20	1,70	0,15	9,5	6,2
EB-34	1420,0	6,2	10	1,70	0,13	0,95	5,9

Comparando-se os resultados da Tabela 6.23 com os da Tabela 6.18 para mesma temperatura e concentração inicial, observa-se que os valores dos parâmetros cinéticos são maiores para o AC.3 que para o AC.1, principalmente k_2 . Esse fato se deve provavelmente a presença de outros componentes do meio de fermentação que

interferem na adsorção do ácido clavulânico.

Após a adsorção, o ácido clavulânico foi eluído utilizando-se 2% (p/v) de solução de NaCl. A Figura 6.33 ilustra os resultados experimentais e simulados obtidos na dessorção do ácido clavulânico. Por essa Figura observa-se que, assim como na etapa de adsorção, o modelo ajusta-se bem aos dados experimentais de dessorção do AC.3 na resina estudada.

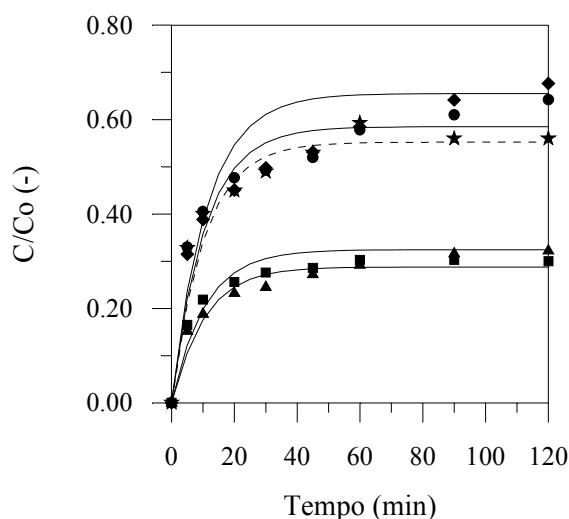


Figura 6.33: Curvas cinéticas para dessorção do ácido clavulânico. Os pontos experimentais são representados por símbolos. Linhas contínuas representam os valores simulados para pH 6,2 e a linha pontilhada para pH 4,0. • EB-29; ■ EB-31; ★ EB-32; ◆ EB-33; ▲ EB-34. (Barboza et al. 2002c)

Os parâmetros obtidos pela simulação do processo para a etapa de dessorção encontram-se na Tabela 6.24. Assim como na etapa de adsorção, os parâmetros de transporte da etapa de dessorção foram semelhantes tanto para o AC.3 como para o AC.1. Esse fato pode ser observado quando compara-se as Tabelas 6.24 e 6.19. O parâmetro cinético k_3 tem praticamente o mesmo valor para o AC.3 e para o AC.1, mostrando que os componentes do meio de fermentação não prejudicam a dessorção.

Tabela 6.24: Parâmetros cinéticos de transporte da dessorção de AC.3 em tanque agitado. T = 30°C e pH = 6,2. (Barboza et al. 2002c)

Ensaio	NaCl (%)	k_3 min ⁻¹	$D_{ef} 10^5$ cm ² .s ⁻¹	$k_s 10^2$ cm.s ⁻¹
EB-29	2,0	9,5	9,0	7,7
EB-31	2,0	9,5	9,0	5,0
EB-32	2,0	9,7	8,3	6,4
EB-33	2,0	9,0	9,0	7,2
EB-34	10,0	1,0	1,0	1,0

6.8 PROCESSO CONTÍNUO

6.8.1 SIMULAÇÃO DO PROCESSO CONTÍNUO

O processo contínuo de adsorção de AC foi inicialmente simulado com o objetivo de obter informações sobre sua dinâmica, das variáveis utilizadas e das faixas de operação a serem utilizadas na parte experimental. As simulações forneceram indicações sobre os valores de θ_{r1} , θ_{r2} , θ_{s1} , θ_{s2} , ϵ_{r1} e ϵ_{r2} que otimizam os parâmetros Y, FP e FC.

Para as simulações escolheram-se valores arbitrários para a fração de líquido em cada estágio (ϵ_r), concentração inicial de AC (C_0), tempos de residência do reator e de sólidos e volumes dos reatores. Esses parâmetros estão apresentados na Tabela 6.25.

Tabela 6.25: Parâmetros utilizados nas simulações (Almeida et al., 2001).

Simul.	C_0 g.L ⁻¹	θ_{r1} min	θ_{r2} min	θ_{s1} min	θ_{s2} min	ϵ_{r1} (-)	ϵ_{r2} (-)	V_1 mL	V_2 mL
1	0,100	71,3	44,1	108,0	154,8	0,86	0,60	130	130
2	0,100	71,3	44,1	108,0	107,2	0,86	0,60	130	90
3	0,100	81,0	30,6	101,1	100,7	0,86	0,60	130	90
4	0,100	81,0	30,6	101,1	65,2	0,86	0,60	200	90

As vazões de operação estão apresentadas na Tabela 6.26 e foram calculadas utilizando-se as Equações de 20 a 22 e aplicando-se a essas Equações os valores da Tabela 6.25.

Tabela 6.26: Condições de operação (Almeida et al., 2001).

Ensaio	F ₁ (mL/min)	F ₂ (mL/min)	F _r (mL/min)
1	0,62	2,10	1,39
2	0,62	1,20	1,39
3	0,32	2,04	1,49
4	0,49	1,56	2,30

Os parâmetros de transporte (D_{ef} e k_s) e os parâmetros cinéticos (k_1 , k_2 , k_3) utilizados nas simulações foram obtidos no estudo cinético em batelada em tanque agitado e mostrados na Tabela 6.23 para a etapa de adsorção e na Tabela 6.24 para etapa de dessorção para as condições do Ensaio EB-29.

Os dados da Tabela 6.26 e os parâmetros cinéticos, de equilíbrio e de transporte obtidos no processo de adsorção e dessorção em batelada, permitiram simular o processo contínuo de adsorção de ácido clavulânico na resina Amberlite IRA 400 no ciclo cloreto. A Figura 6.34 mostra os perfis de concentração de AC e de contaminantes na saída de cada estágio para as simulações 1, 2, 3 e 4. Nessas simulações não se têm os perfis de concentração de eluente. Para estudar os perfis de concentração de solução de NaCl é necessário que se tenha a relação das constantes cinéticas e de equilíbrio com a concentração de solução de NaCl.

Pela Figura 6.34 pode-se observar que o AC e os contaminantes são adsorvidos e dessorvidos pela resina utilizada, o que deve acarretar em um baixo valor do fator de purificação, porém maior que 1. O fator de concentração deve ser muito baixo, pois a concentração de AC no primeiro estágio é maior que no segundo. O tempo para atingir o equilíbrio foi de aproximadamente 3 horas de processo. Os valores dos parâmetros rendimento (Y), fator de purificação (FP) e fator de concentração (FC) obtidos nas simulações 1, 2, 3 e 4 estão apresentados na Tabela 6.27.

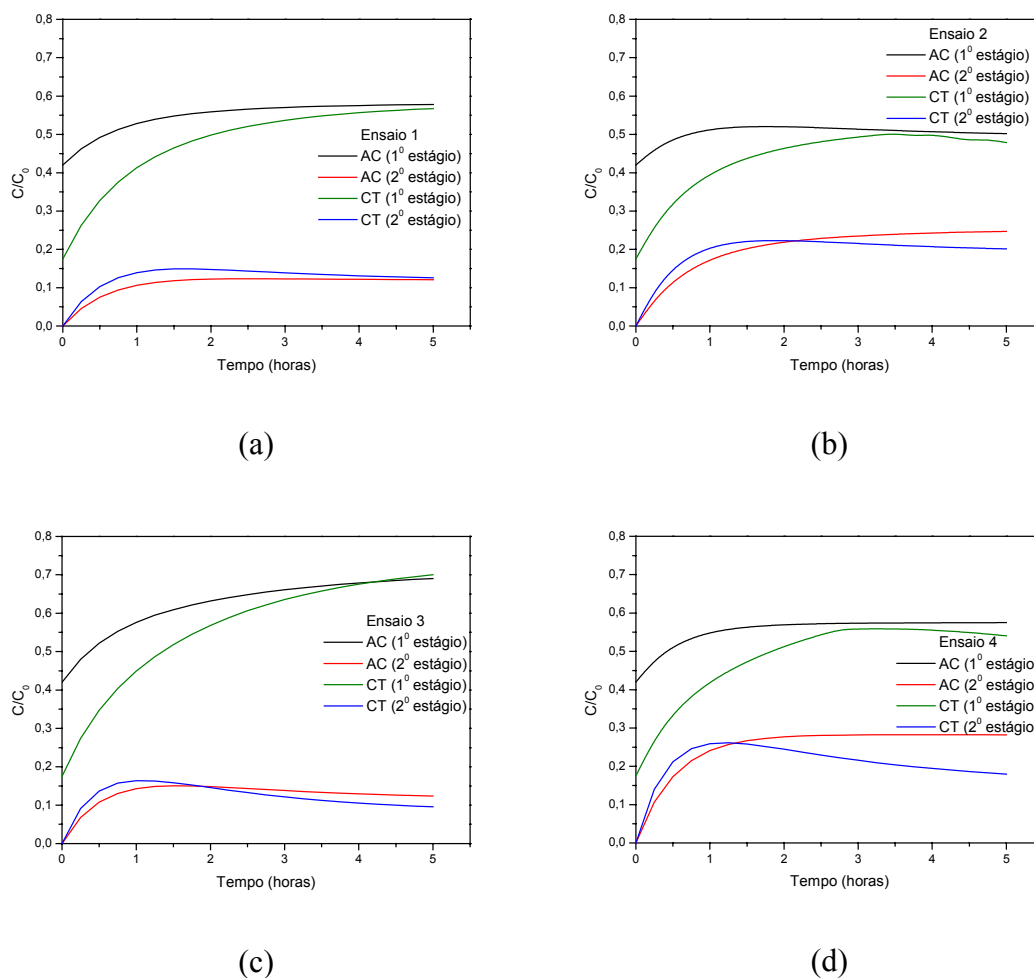


Figura 6.34: Simulações do processo contínuo de purificação de AC. (a) Simulação 1; (b) Simulação 2; (c) Simulação 3; (d) Simulação 4. (Almeida et al., 2001).

Tabela 6.27: Resultados obtidos para o rendimento (Y), fator de purificação (FP) e fator de concentração (FC). (Almeida et al., 2001).

Simulação	Y (%)	FP (-)	FC (-)
1	41,1	0,95	0,12
2	48,0	1,23	0,25
3	79,0	1,29	0,12
4	90,0	1,57	0,28

Observando-se a Tabela 6.27 pode-se notar que este processo, tal como proposto, pode fornecer um alto valor para o rendimento, no entanto não é um processo capaz de concentrar o produto desejado como observado pelos baixos valores de FC obtidos nas 4 simulações. Com relação ao fator de purificação, observou-se que a proporção de

saída de AC em relação à concentração do contaminante foi ligeiramente maior no 2º estágio, proporcionando a purificação, mesmo que baixa, do meio.

Ainda observando-se a Tabela 6.27 pode-se notar que os valores de Y, FP e FC são mais altos trabalhando-se com volume maior no 1º reator, conforme observado quando se compara esses parâmetros da simulação 4 ($V_1=200$ mL) com os da simulação 3 ($V_1=130$ mL). Nessas duas simulações foram mantidos os mesmos tempos de residência do reator e de sólidos no primeiro estágio, porém aumentou-se o volume do primeiro estágio na simulação 4 obtendo-se um rendimento 12% maior que na simulação 3. Para o segundo reator, entretanto é melhor utilizar um volume menor como é possível observar comparando a simulação 1 ($V_1=130$ mL) e a simulação 2 ($V_1=90$ mL).

Os melhores resultados obtidos para Y, FP e FC foram os da simulação 4, porém por ser um processo que envolve uma série de variáveis só foi melhor avaliado mediante a otimização do processo e validação do modelo sugerido através de experimentos para o processo contínuo de purificação de AC.

6.8.2 ENSAIOS DO PROCESSO CONTÍNUO

Com o objetivo de validar o modelo matemático para o processo contínuo de adsorção de AC foram realizados ensaios experimentais usando as condições operacionais das simulações 2 e 4 (Tabela 6.26). Esses ensaios estão representados nas Figuras 6.35 e 6.36 para as condições das simulação 2 e 4, respectivamente. A etapa de adsorção foi realizada a 10°C e a etapa de dessorção a 30°C, mas as duas etapas foram realizadas em pH 6,2 (Almeida et al., 2003a).

Nas Figuras 6.35 e 6.36 é possível observar que a concentração de AC no segundo reator foi menor que no primeiro, assim, como o modelo previu, foi obtido um baixo FC também nos ensaios experimentais. Os parâmetros Y, FP e FC foram calculados para os ensaios experimentais e estão mostrados na Tabela 6.28, juntamente com esses mesmos parâmetros obtidos na simulação e a diferença entre os valores experimentais e simulados. Os valores do fator de purificação ficaram em torno dos valores obtidos por Mayer et al. (1996) em leito fixo, porém o rendimento foi bem maior que o obtidos por estes autores. Mayer et al. (1996) conseguiram concentrar o produto em duas vezes o que não foi possível no processo do presente trabalho.

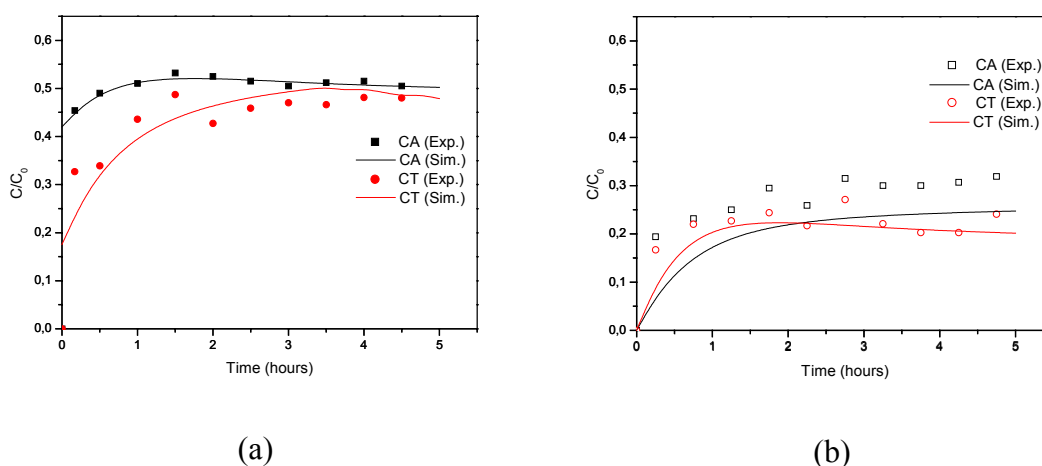


Figura 6.35: Resultados simulados e experimentais do processo contínuo de adsorção de AC da simulação 2. (a) primeiro reator; (b) segundo reator. (Almeida et al., 2003a).

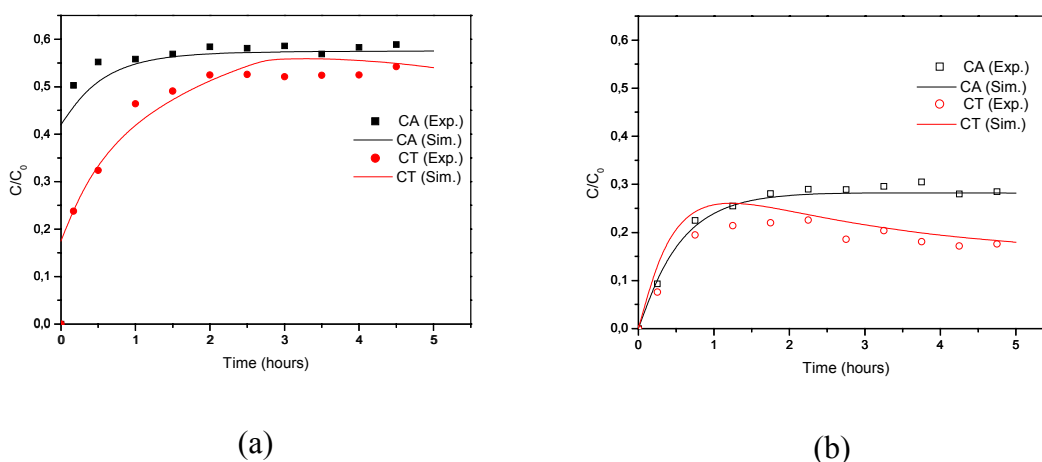


Figura 6.36: Resultados simulados e experimentais do processo contínuo de adsorção de AC da simulação 4. (a) primeiro reator; (b) segundo reator. (Almeida et al., 2003a).

Tabela 6.28: Resultados experimentais e simulados de rendimento (Y), fator de purificação (FP) e fator de concentração (FC) e a diferença entre os resultados experimentais e simulados (e) (Almeida et al., 2003a).

Ensaio	Y (%)			PF (-)			CF (-)		
	Exp	Sim	e (%)	Exp	Sim	e (%)	Exp	Sim	e (%)
2	58,10	48,00	17%	1,48	1,23	17%	0,30	0,25	17%
4	96,90	90,00	7%	1,69	1,57	7%	0,31	0,28	9%

Pelos resultados da Tabela 6.28 observa-se que o modelo previu todos os parâmetros com um erro entre 7 e 17%. Essas diferenças podem estar relacionadas tanto com alguns problemas operacionais dos ensaios experimentais, como com falta de ajuste do modelo matemático.

As simulações aqui apresentadas, tanto para o processo contínuo como para o processo em batelada em tanque agitado, mostraram que os modelos propostos descreveram bem o comportamento do processo de adsorção do ácido clavulânico, puro ou fermentado, na resina de troca iônica Amberlite IRA 400-Cl.

6.9 OTIMIZAÇÃO DE PARÂMETROS DO PROCESSO CONTÍNUO

No estudo do processo contínuo de adsorção do ácido clavulânico foi necessária a realização de um processo de otimização dos parâmetros utilizados nas simulações e condições operacionais a fim de que as respostas tais como rendimento (Y) e fatores de concentração (FC) e purificação (FP) fossem maximizadas.

Nesta etapa do trabalho foi realizado um procedimento similar ao apresentado por Barboza (1998). Foi estudada a influência de seis variáveis no processo de purificação. Estas estão presentes nos modelos matemáticos para o processo contínuo, apresentado no item 5.3: tempos de residência no reator e de sólidos (θ_{r1} , θ_{r2} e θ_{s1}), frações líquidas nos tanques agitados (ε_{r1} e ε_{r2}) e concentração inicial (C_0) de AC em solução.

Todo o processo de otimização foi realizado através de análise de superfície de resposta no *software* Statística 5.0, para se chegar a resultados de faixas dos parâmetros anteriores que maximizaram as variáveis rendimento (Y), fator de concentração (FC) e fator de purificação (FP).

6.9.1 ESTUDO DO PROCESSO POR ANÁLISE DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA

A análise de superfície de resposta é uma técnica de planejamento experimental baseada no método de planejamento fatorial, o número de experimentos ou simulações deve ser igual a 2^n+1 , onde n é o número de variáveis independentes e o +1 é o ponto

central. Para o presente trabalho, onde se trabalhou com seis variáveis independentes, têm-se o valor de $2^6 + 1 = 65$ simulações a serem executadas para se realizar o planejamento fatorial completo. As características para esse tipo de planejamento é que o modelo fornecido é de primeira ordem, ou seja, as variáveis Y, FC e FP devem ser fornecidas como uma função de todos os parâmetros estudados para o planejamento.

Para iniciar o estudo determinou-se o intervalo para cada variável independente. Esse processo está descrito no item 4.5. Na Tabela 6.29 estão apresentados as possíveis combinações das seis variáveis estudadas nos níveis (-1), (0) e (+1).

Tabela 6.29: Matriz de planejamento utilizada na otimização do parâmetro Y do processo contínuo de adsorção de AC.

Ensaio	C_0 (g/L)	θ_{r1} (min)	θ_{r2} (min)	θ_{s1} (min)	ϵ_{r1} (-)	ϵ_{r2} (-)	Y (%)	FC (-)	FP (-)
1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	69,50	0,295	1,91
2	1	-1	-1	-1	-1	-1	65,10	0,276	1,79
3	-1	1	-1	-1	-1	-1	99,85	0,235	2,15
4	1	1	-1	-1	-1	-1	87,60	0,206	1,88
5	-1	-1	1	-1	-1	-1	48,76	0,440	1,64
6	1	-1	1	-1	-1	-1	44,50	0,400	1,50
7	-1	1	1	-1	-1	-1	73,18	0,366	1,84
8	1	1	1	-1	-1	-1	61,97	0,310	1,56
9	-1	-1	-1	1	-1	-1	55,14	0,297	1,87
10	1	-1	-1	1	-1	-1	53,07	0,286	1,80
11	-1	1	-1	1	-1	-1	70,08	0,260	1,98
12	1	1	-1	1	-1	-1	65,43	0,240	1,84
13	-1	-1	1	1	-1	-1	41,50	0,430	1,65
14	1	-1	1	1	-1	-1	39,25	0,406	1,56
15	-1	1	1	1	-1	-1	53,90	0,381	1,75
16	1	1	1	1	-1	-1	49,13	0,347	1,60
17	-1	-1	-1	-1	1	-1	61,78	0,235	2,00
18	1	-1	-1	-1	1	-1	58,17	0,220	1,88
19	-1	1	-1	-1	1	-1	86,90	0,184	2,23
20	1	1	-1	-1	1	-1	76,95	0,163	1,98

Continua Tabela 6.29

21	-1	-1	1	-1	1	-1	48,48	0,353	1,78
22	1	-1	1	-1	1	-1	44,50	0,324	1,63
23	-1	1	1	-1	1	-1	71,26	0,288	1,99
24	1	1	1	-1	1	-1	60,88	0,246	1,70
25	-1	-1	-1	1	1	-1	48,56	0,242	1,95
26	1	-1	-1	1	1	-1	46,86	0,233	1,88
27	-1	1	-1	1	1	-1	61,12	0,208	2,05
28	1	1	-1	1	1	-1	57,31	0,195	1,92
29	-1	-1	1	1	1	-1	39,37	0,351	1,76
30	1	-1	1	1	1	-1	37,33	0,333	1,67
31	-1	1	1	1	1	-1	50,59	0,308	1,86
32	1	1	1	1	1	-1	46,31	0,282	1,71
33	-1	-1	-1	-1	-1	1	75,76	0,457	1,67
34	1	-1	-1	-1	-1	1	70,06	0,423	1,54
35	-1	1	-1	-1	-1	1	103,98	0,382	1,88
36	1	1	-1	-1	-1	1	97,93	0,328	1,62
37	-1	-1	1	-1	-1	1	27,40	0,674	1,30
38	1	-1	1	-1	-1	1	24,70	0,607	1,17
39	-1	1	1	-1	-1	1	43,08	0,588	1,44
40	1	1	1	-1	-1	1	35,80	0,488	1,19
41	-1	-1	-1	1	-1	1	63,89	0,441	1,68
42	1	-1	-1	1	-1	1	61,13	0,422	1,61
43	-1	1	-1	1	-1	1	83,11	0,393	1,78
44	1	1	-1	1	-1	1	76,82	0,363	1,64
45	-1	-1	1	1	-1	1	35,12	0,627	1,39
46	1	-1	1	1	-1	1	33,03	0,590	1,30
47	-1	1	1	1	-1	1	46,76	0,571	1,47
48	1	1	1	1	-1	1	42,21	0,516	1,32
49	-1	-1	-1	-1	1	1	74,85	0,364	1,81
50	1	-1	-1	-1	1	1	69,70	0,339	1,68
51	-1	1	-1	-1	1	1	101,80	0,296	2,04
52	1	1	-1	-1	1	1	95,38	0,257	1,77

53	-1	-1	1	-1	1	1	43,52	0,540	1,49
54	1	-1	1	-1	1	1	39,50	0,490	1,35
55	-1	1	1	-1	1	1	66,74	0,460	1,66
56	1	1	1	-1	1	1	56,02	0,386	1,39
57	-1	-1	-1	1	1	1	60,44	0,360	1,79
58	1	-1	-1	1	1	1	58,01	0,345	1,72
59	-1	1	-1	1	1	1	77,62	0,316	1,89
60	1	1	-1	1	1	1	72,14	0,294	1,76
61	-1	-1	1	1	1	1	40,84	0,516	1,53
62	1	-1	1	1	1	1	38,52	0,487	1,45
63	-1	1	1	1	1	1	53,64	0,463	1,63
64	1	1	1	1	1	1	48,68	0,421	1,47
65	0	0	0	0	0	0	59,55	0,367	1,67

Para a obtenção dos valores de Y, FC e FP na Tabela 6.29 foram realizadas simulações utilizando-se a modelagem matemática descrita para o processo contínuo de adsorção de ácido clavulânico no item 5.3.

6.9.2 INFLUÊNCIA DAS VARIÁVEIS DO PROCESSO CONTÍNUO NO RENDIMENTO

Uma análise foi feita para estudar os efeitos que cada variável e suas combinações (C_0 , θ_{r1} , θ_{r2} , θ_{s1} , ε_{r1} e ε_{r2}) apresentaram no rendimento. Na Figura 6.37 estão apresentados os efeitos dessas variáveis no parâmetro Y calculados pelo *software* Statistica 5.0.

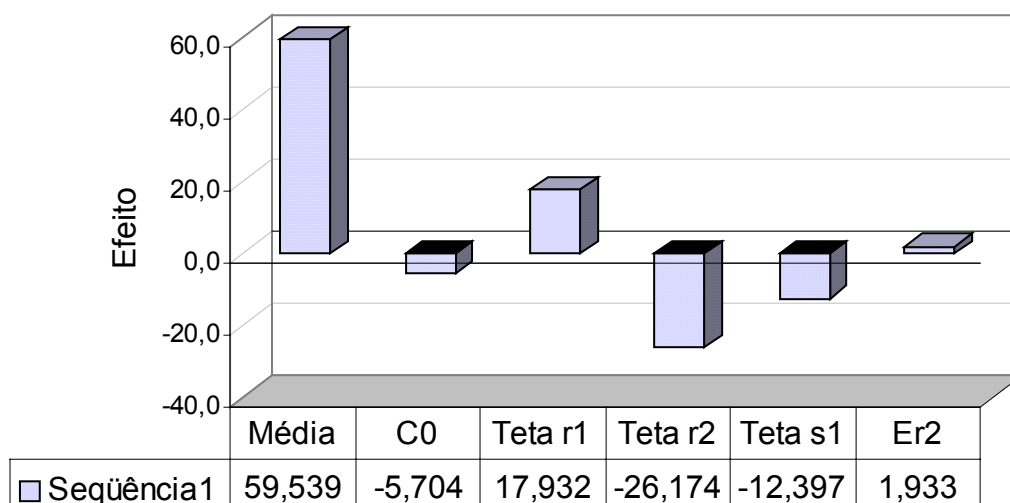


Figura 6.37: Curva representativa dos efeitos das principais variáveis do processo contínuo no estudo do parâmetro Y.

A Figura 6.37 mostra quais variáveis exercem maior e menor influência na determinação do rendimento. Pode-se observar que a variável com menor efeito é a fração de líquido no segundo reator e a com maior efeito é o tempo de residência do segundo reator. O *software* citado fornece ainda os efeitos das interações entre essas variáveis. A relação completa dos efeitos significativos calculados podem ser observados na Tabela B.1 do Apêndice B.

Continuando a análise, o *software* Statistica 5.0 forneceu, por ajuste não linear, o modelo de 1ª ordem ajustado para a matriz de planejamento utilizada. Esse modelo está representado na Equação 53:

$$\begin{aligned}
 Y = & 59,539 - 2,852.C_0 + 8,966.\theta_{r1} - 13,087.\theta_{r2} - 6,198.\theta_{s1} + 0,966.\epsilon_{r2} - 1,243.C_0.\theta_{r1} + \\
 & 1,088.C_0.\theta_{s1} - 1,659.\theta_{r1}.\theta_{r2} - 2,629.\theta_{r1}.\theta_{s1} + 0,510.\theta_{r1}.\epsilon_{r2} + 3,257.\theta_{r2}.\theta_{s1} + \\
 & 2,793.\theta_{r2}.\epsilon_{r1} - 5,196.\theta_{r2}.\epsilon_{r2} - 0,898.\theta_{s1}.\epsilon_{r1} + 1,440.\theta_{s1}.\epsilon_{r2} + 2,441.\epsilon_{r1}.\epsilon_{r2} + 0,583. \\
 & C_0.\theta_{r1}.\theta_{s1} + 0,713.\theta_{r1}.\theta_{r2}.\theta_{s1} + 0,509.\theta_{r1}.\theta_{r2}.\epsilon_{r1} - 0,923.\theta_{r1}.\theta_{r2}.\epsilon_{r2} + \\
 & 0,376.\theta_{r1}.\epsilon_{r1}.\epsilon_{r2} - 0,887.\theta_{r2}.\theta_{s1}.\epsilon_{r1} + 1,628.\theta_{r2}.\theta_{s1}.\epsilon_{r2} + 1,085.\theta_{r2}.\epsilon_{r1}.\epsilon_{r2} - \\
 & 0,945.\theta_{s1}.\epsilon_{r1}.\epsilon_{r2}
 \end{aligned}
 \tag{53}$$

A análise estatística para o modelo apresentado na Equação 53 foi obtida a partir dos dados apresentados na Tabela 6.30.

Tabela 6.30: Análise de variância para ajuste do modelo linear para Y.

	Soma Quadrática (SQ)	Graus de liberdade	Média Quadrática (MQ)
Regressão (R)	23914,24	25 (p-1)	956,57
Resíduo (r)	71,82	39 (n-p)	1,841
Falta de ajuste	71,82	39 (m-p)	1,841
Total (SQ _R + SQ _r)	23986,06	64	-

p: número de parâmetros do modelo

n: número de ensaios

m: número distinto

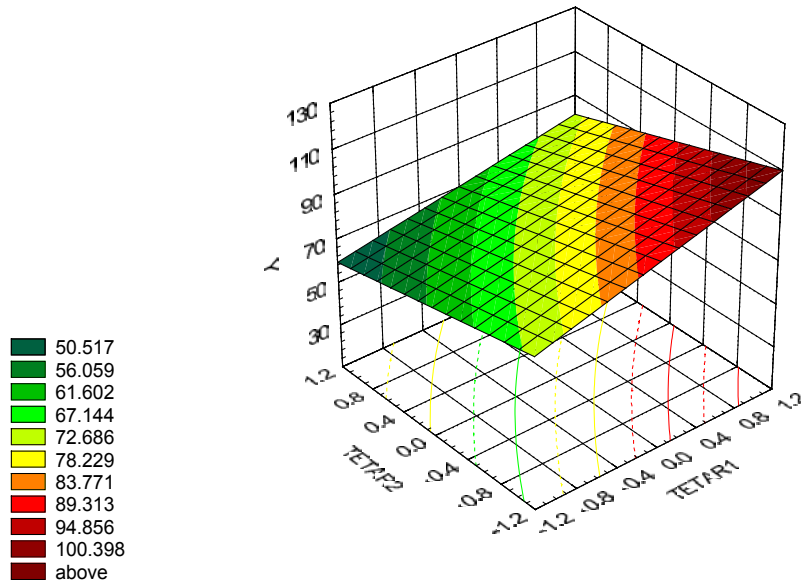
Coefficiente de correlação = 0,997 (SQ_R/SQ_{total})

Teste de F: Calculado $F_{25,39} = 519,59$ (MQ_R/MQ_r)

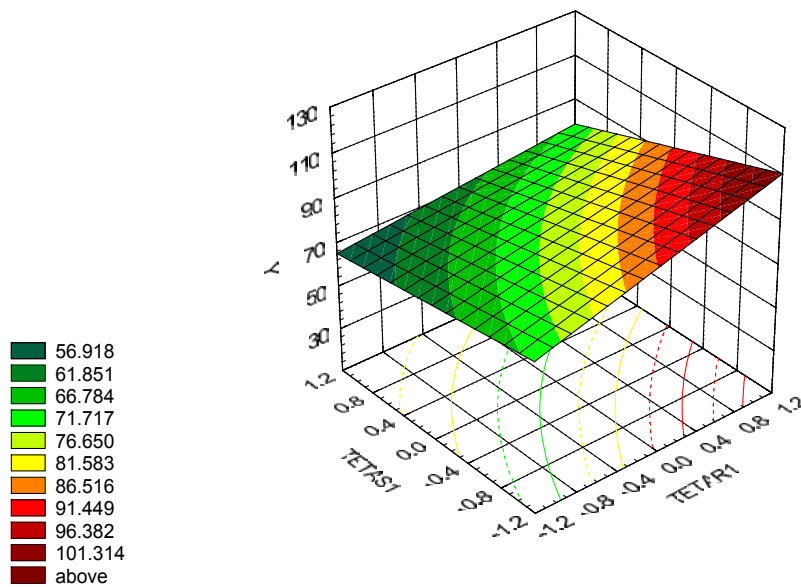
Tabelado $F_{25,39} \sim 1,79$ (95% de confiança)

Os ensaios da Tabela 6.29 referem-se a simulações em computador, portanto, não é possível calcular o erro puro, pois este referente aos erros dos ensaios experimentais. Assim o resíduo é sempre igual a falta de ajuste e o número distinto m é sempre igual ao número de ensaios, n. De acordo com os resultados obtidos com o teste de F, os ensaios estão bem representados pelo modelo de primeira ordem. Verifica-se também que o coeficiente de correlação está bem próximo ao valor 1 mostrando que o modelo foi ajustado satisfatoriamente aos pontos da matriz de planejamento.

Para visualizar o comportamento da variável Y frente às variáveis utilizadas para o estudo, combinadas de duas em duas, fez-se as curvas apresentadas nas Figuras de 6.38 a 6.42.

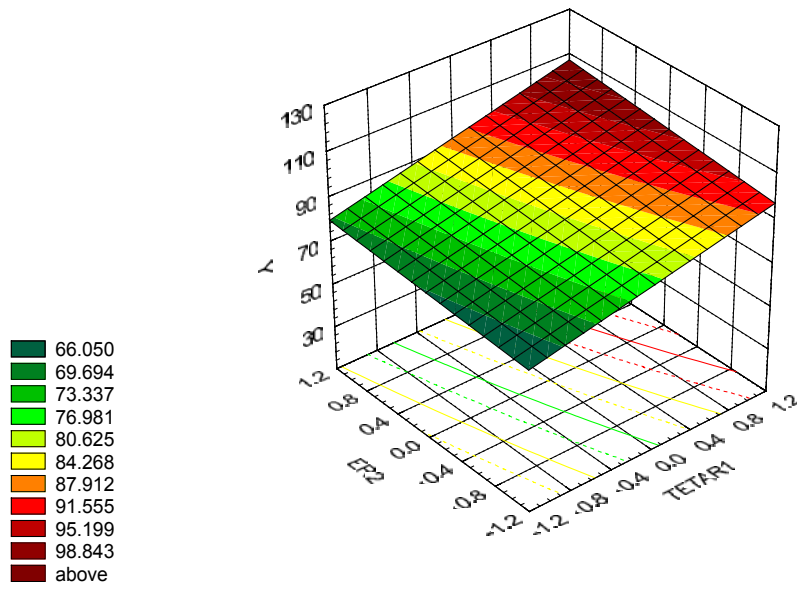


(a)

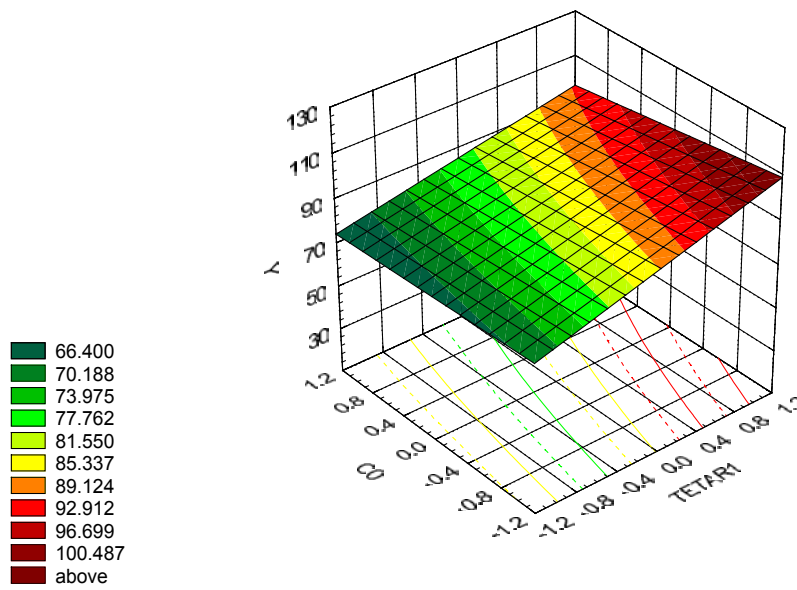


(b)

Figura 6.38: (a) Curva de Y em função θ_{r1} e θ_{r2} ($\theta_{s1} = -1$; $\epsilon_{r1} = -1$; $\epsilon_{r2} = +1$; $C_0 = -1$);
 (b) Curva de Y em função θ_{r1} e θ_{s1} ($\theta_{r2} = -1$; $\epsilon_{r1} = -1$; $\epsilon_{r2} = +1$; $C_0 = -1$).

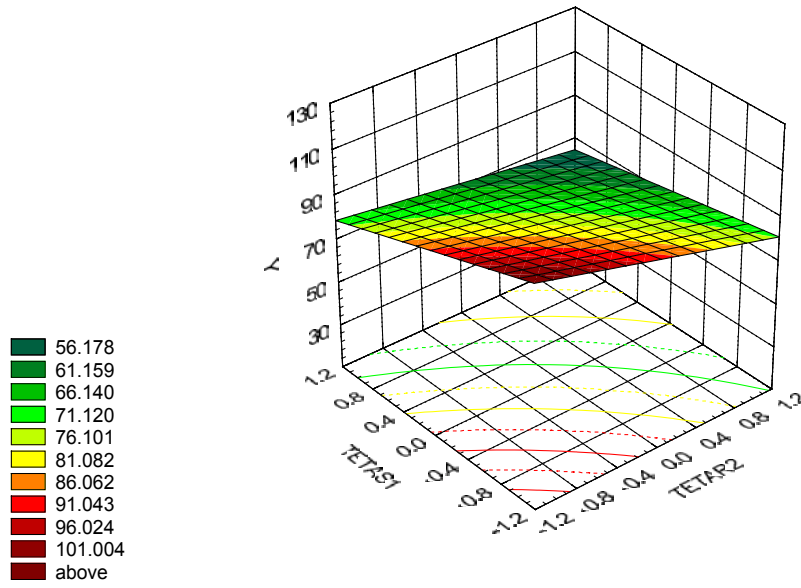


(a)

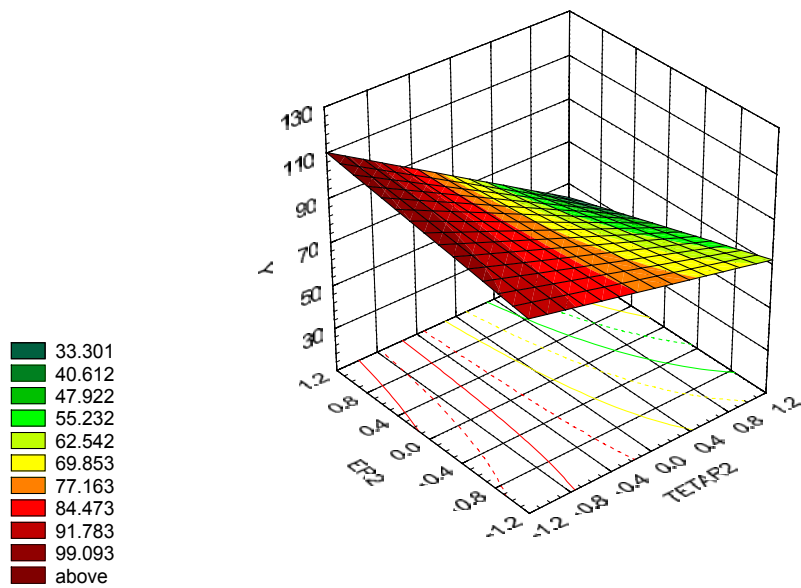


(b)

Figura 6.39: (a) Curva de Y em função θ_{r_1} e ϵ_{r_2} ($\theta_{r_2} = -1$; $\theta_{s_1} = -1$; $\epsilon_{r_1} = -1$; $C_0 = -1$); (b) Curva de Y em função θ_{r_1} e C_0 ($\theta_{r_2} = -1$; $\theta_{s_1} = -1$; $\epsilon_{r_1} = -1$; $\epsilon_{r_2} = +1$).

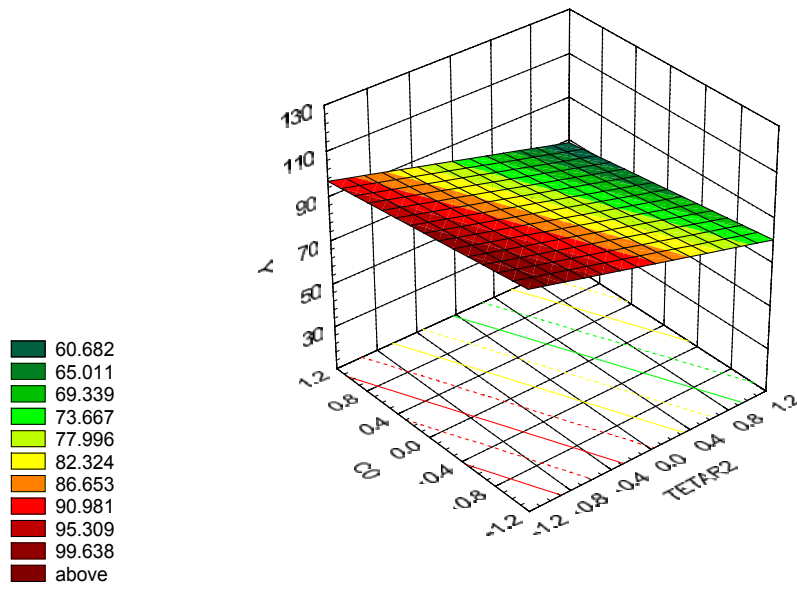


(a)

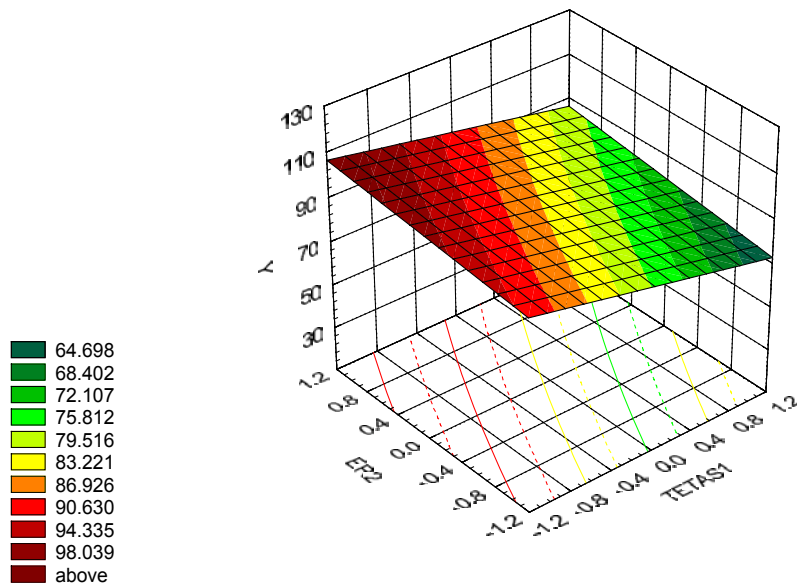


(b)

Figura 6.40: (a) Curva de Y em função θ_{r2} e θ_{s1} ($\theta_{r1} = +1$; $\epsilon_{r1} = -1$; $\epsilon_{r2} = +1$; $C_0 = -1$);
 (b) Curva de Y em função θ_{r2} e ϵ_{r2} ($\theta_{r1} = +1$; $\theta_{s1} = -1$; $\epsilon_{r1} = -1$; $C_0 = -1$).

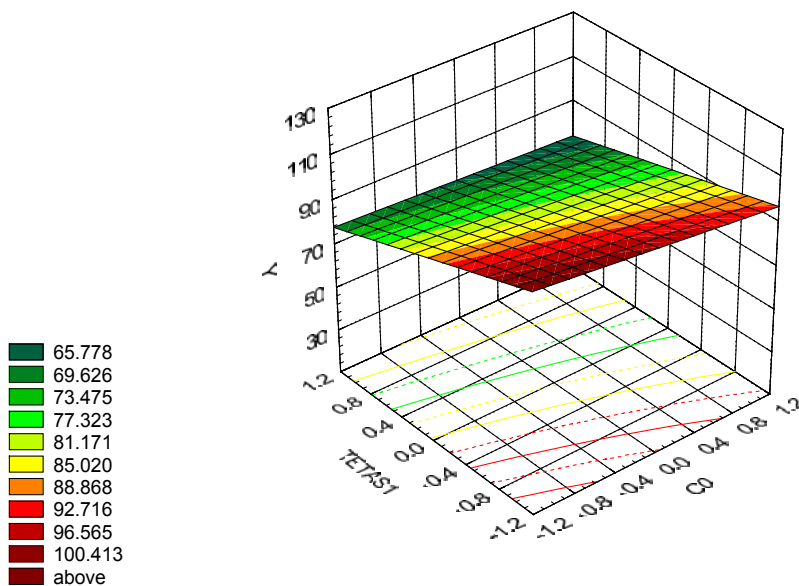


(a)

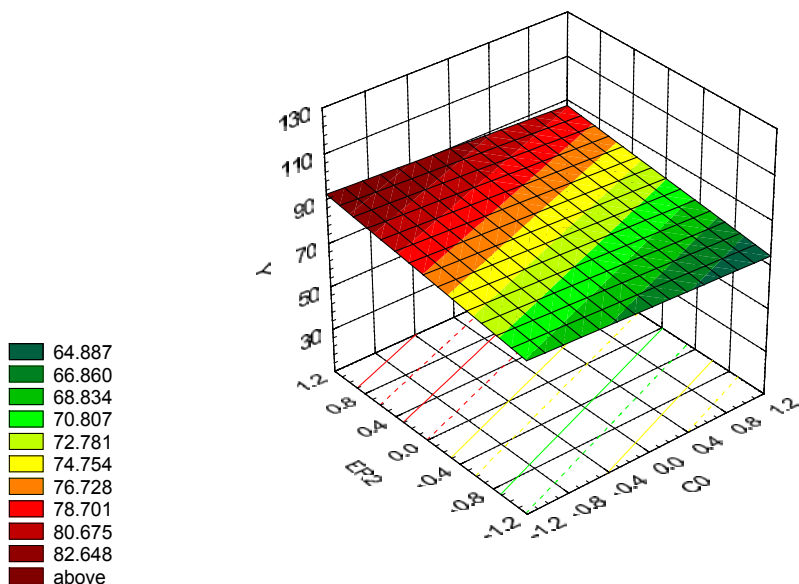


(b)

Figura 6.41: (a) Curva de Y em função θ_{r_2} e C_0 ($\theta_{r_1} = +1$; $\theta_{s_1} = -1$; $\epsilon_{r_1} = -1$; $\epsilon_{r_2} = +1$);
 (b) Curva de Y em função θ_{s_1} e ϵ_{r_2} ($\theta_{r_1} = +1$; $\theta_{r_2} = -1$; $\epsilon_{r_1} = -1$; $C_0 = -1$).



(a)



(b)

Figura 6.42: (a) Curva de Y em função θ_{s1} e C_0 ($\theta_{r1} = +1$; $\theta_{r2} = -1$; $\epsilon_{r1} = -1$; $\epsilon_{r2} = +1$);
 (b) Curva de Y em função ϵ_{r2} e C_0 ($\theta_{r1} = +1$; $\theta_{r2} = -1$; $\theta_{s1} = -1$; $\epsilon_{r1} = -1$).

A Tabela 6.31 apresenta os valores para as variáveis independentes que maximizam o rendimento de extração.

Tabela 6.31: Intervalos das variáveis que otimizam o rendimento (Y).

Variáveis	Intervalo
θ_{r1} (min)	68,0 – 73,0
θ_{r2} (min)	24,5 – 30,6
θ_{s1} (min)	91 – 101,1
ε_{r1} (-)	Indiferente
ε_{r2} (-)	0,60 – 0,72
C_0 (g/L)	0,075 – 0,100

Comparando-se a Tabela 6.31 com a Tabela 4.2, pode-se afirmar que: para se obter rendimentos altos deve-se trabalhar no limite +1 de θ_{r1} . Já com a variável θ_{r2} , deve-se trabalhar no limite -1. Para a variável θ_{s1} , pode-se trabalhar próximo ao limite inferior (-1). Para a variável ε_{r2} , tem-se melhores rendimentos para o limite +1. Já para ε_{r1} , o modelo mostra que essa variável não tem efeito significativo para o processo. Por fim, para C_0 o rendimento é maximizado para próximo do limite -1.

Para se chegar aos resultados para as variáveis FC e FP devem ser realizadas as mesmas análises feitas para a variável rendimento.

6.9.3 INFLUÊNCIA DAS VARIÁVEIS DO PROCESSO CONTÍNUO NO FATOR DE CONCENTRAÇÃO

Uma análise foi feita para estudar os efeitos que cada variável (C_0 , θ_{r1} , θ_{r2} , θ_{s1} , ε_{r1} e ε_{r2}) apresentam no fator de concentração. Na Figura 6.43 estão apresentados os efeitos dessas variáveis no parâmetro fator de concentração calculados pelo *software* Statistica 5.0.

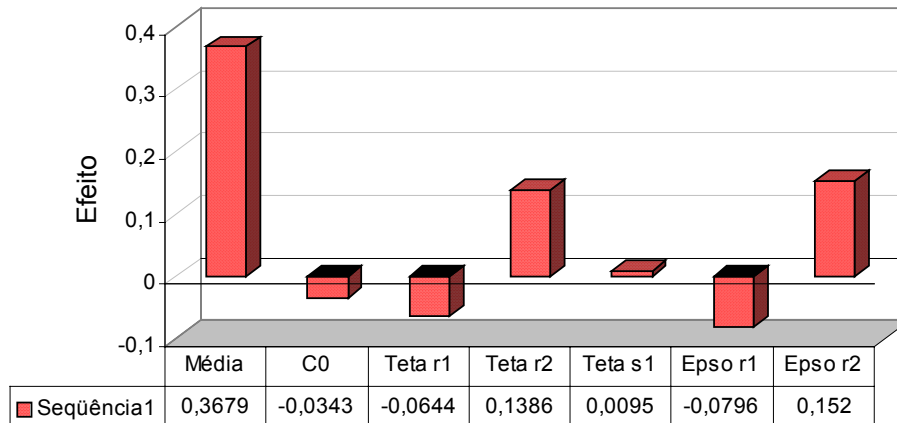


Figura 6.43: Curva representativa dos efeitos das principais variáveis do processo contínuo no estudo do parâmetro fator de concentração.

A Figura 6.43 mostra quais variáveis exercem maior e menor influência na determinação do fator de concentração. Pode-se observar que a variável com menor efeito é o tempo de residência dos sólidos do segundo reator e a com maior efeito são duas: o tempo de residência do segundo reator e a fração de líquido do segundo reator. O software citado fornece ainda os efeitos das interações entre essas variáveis. A relação completa dos efeitos significativos calculados podem ser observados na Tabela B.2 do Apêndice B.

Continuando a análise, o *software* Statistica 5.0 forneceu, por ajuste não linear, o modelo de 1ª ordem ajustado para a matriz de planejamento utilizada. Esse modelo está representado na Equação 54:

$$\begin{aligned}
 FC = & 0,3679 - 0,0172.C_0 - 0,0322.\theta_{r1} + 0,0693.\theta_{r2} + 0,0047.\theta_{s1} - 0,0398.\epsilon_{r1} + \\
 & 0,0760.\epsilon_{r2} - 0,0034.C_0.\theta_{r1} - 0,0054.C_0.\theta_{r2} + 0,0045.C_0.\theta_{s1} + 0,0025.C_0.\epsilon_{r1} - \\
 & 0,0045.C_0.\epsilon_{r2} - 0,0036.\theta_{r1}.\theta_{r2} + 0,0070.\theta_{r1}.\theta_{s1} + 0,0021.\theta_{r1}.\epsilon_{r1} - 0,0040.\theta_{r1}.\epsilon_{r2} - \\
 & 0,0026.\theta_{r2}.\theta_{s1} - 0,0069.\theta_{s1}.\epsilon_{r1} + 0,0133.\theta_{r2}.\epsilon_{r2} + 0,0018.\theta_{s1}.\epsilon_{r1} - 0,0033.\theta_{s1}.\epsilon_{r2} - \\
 & 0,0082.\epsilon_{r1}.\epsilon_{r2} - 0,0008.C_0.\theta_{r1}.\theta_{r2} + 0,0009.C_0.\theta_{r1}.\theta_{s1} + 0,0006.C_0.\theta_{r1}.\epsilon_{r1} - \\
 & 0,0010.C_0.\theta_{r1}.\epsilon_{r2} + 0,0015.C_0.\theta_{r2}.\theta_{s1} + 0,0007.C_0.\theta_{r2}.\epsilon_{r1} - 0,0013.C_0.\theta_{r2}.\epsilon_{r2} - \\
 & 0,0007.C_0.\theta_{s1}.\epsilon_{r1} + 0,0015.C_0.\theta_{s1}.\epsilon_{r2} + 0,0006.C_0.\epsilon_{r1}.\epsilon_{r2} + 0,0007.\theta_{r1}.\theta_{r2}.\theta_{s1} - \\
 & 0,0006.\theta_{r1}.\theta_{s1}.\epsilon_{r1} + 0,0011.\theta_{r1}.\theta_{s1}.\epsilon_{r2} + 0,0007.\theta_{r2}.\theta_{s1}.\epsilon_{r1} - 0,0015.\theta_{r2}.\theta_{s1}.\epsilon_{r2} - \\
 & 0,0012.\theta_{r2}.\epsilon_{r1}.\epsilon_{r2} + 0,0012.\theta_{s1}.\epsilon_{r1}.\epsilon_{r2}
 \end{aligned} \quad (54)$$

A análise estatística para o modelo apresentado na Equação 54 foi obtida a partir dos dados apresentados na Tabela 6.32.

Tabela 6.32: Análise de variância para ajuste do modelo linear para FC.

	Soma Quadrática (SQ)	Graus de liberdade	Média Quadrática (MQ)
Regressão (R)	0,8969	38 (p-1)	0,024
Resíduo (r)	$6,20 \cdot 10^{-5}$	26 (n-p)	$2,385 \cdot 10^{-6}$
Falta de ajuste	$6,20 \cdot 10^{-5}$	26 (m-p)	$2,385 \cdot 10^{-6}$
Total ($SQ_R + SQ_r$)	0,8970	64	-

p: número de parâmetros do modelo

n: número de ensaios

m: número distinto

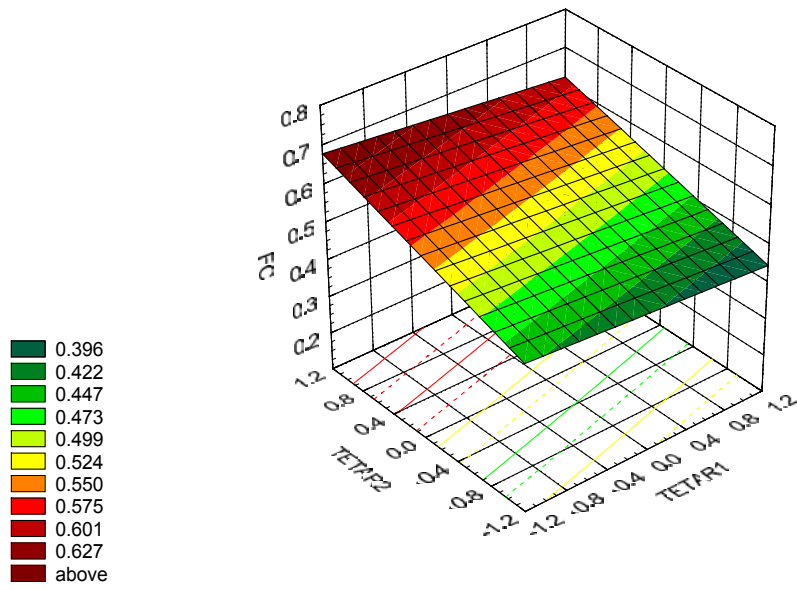
Coefficiente de correlação = 0,999 (SQ_R/SQ_{total})

Teste de F: Calculado $F_{38,26} = 9899,32$ (MQ_R/MQ_r)

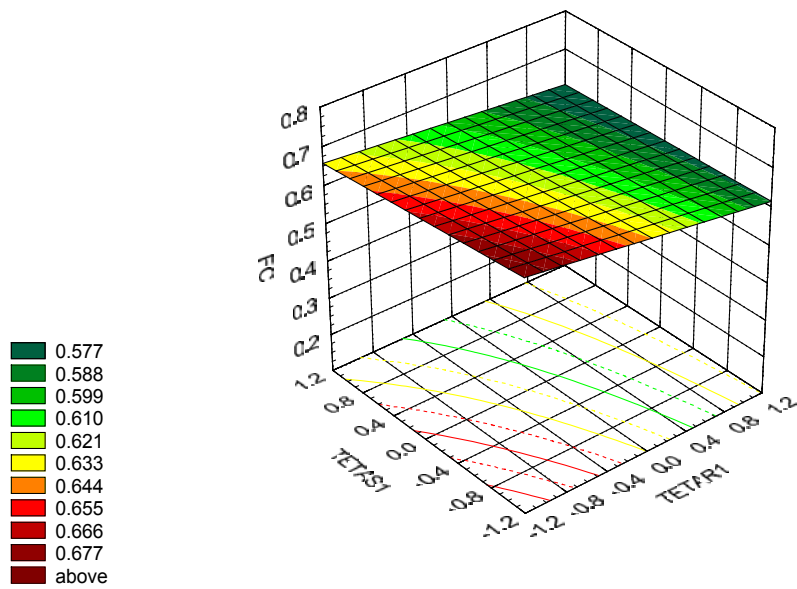
Tabelado $F_{6,58} \sim 1,85$ (95% de confiança)

De acordo com os resultados obtidos com o teste de F, os ensaios estão bem representados pelo modelo de primeira ordem. Verifica-se também que o coeficiente de correlação está bem próximo do valor 1 mostrando que o modelo foi ajustado satisfatoriamente aos pontos da matriz de planejamento.

Para visualizar o comportamento da variável FC frente as variáveis utilizadas para o estudo, combinadas de duas em duas, fez-se as curvas apresentadas nas Figuras de 6.44 a 6.51.

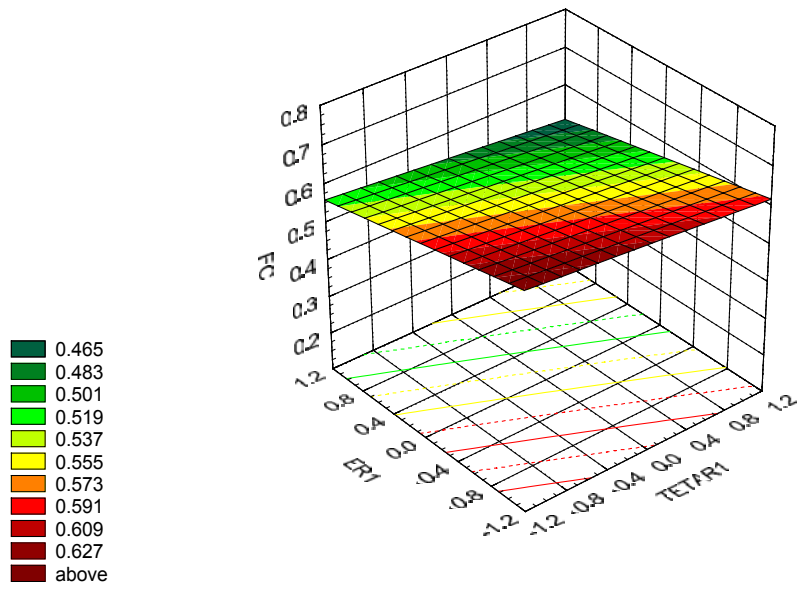


(a)

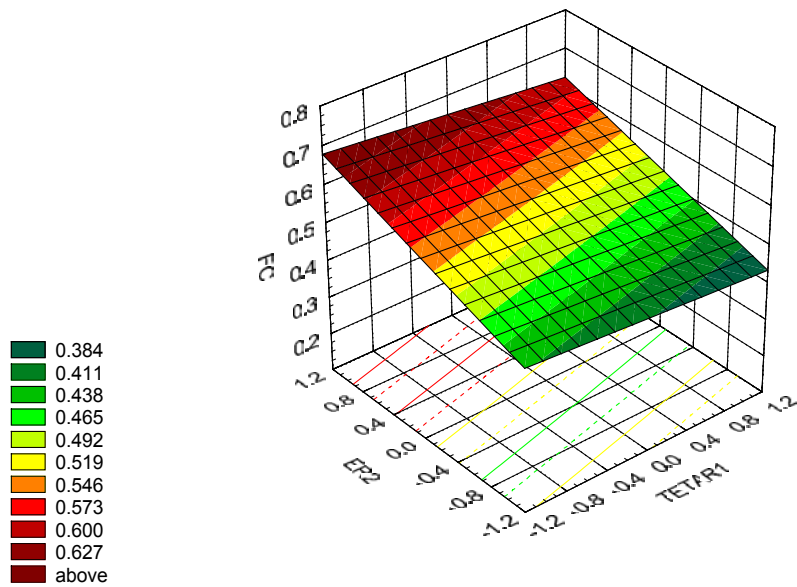


(b)

Figura 6.44: (a) Curva de FC em função θ_{r1} e θ_{r2} ($\theta_{s1} = +1$; $\epsilon_{r1} = -1$; $\epsilon_{r2} = +1$; $C_0 = -1$);
 (b) Curva de FC em função θ_{r1} e θ_{s1} ($\theta_{r2} = +1$; $\epsilon_{r1} = -1$; $\epsilon_{r2} = +1$; $C_0 = -1$).

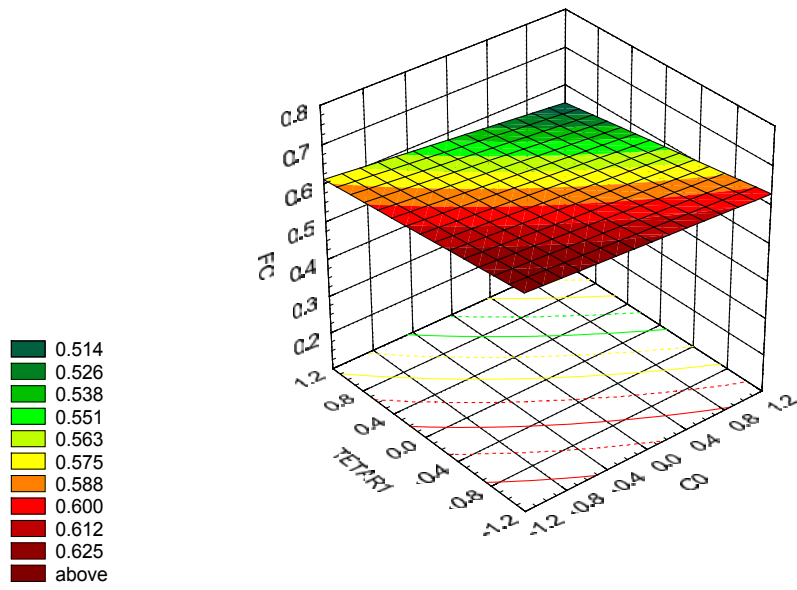


(a)

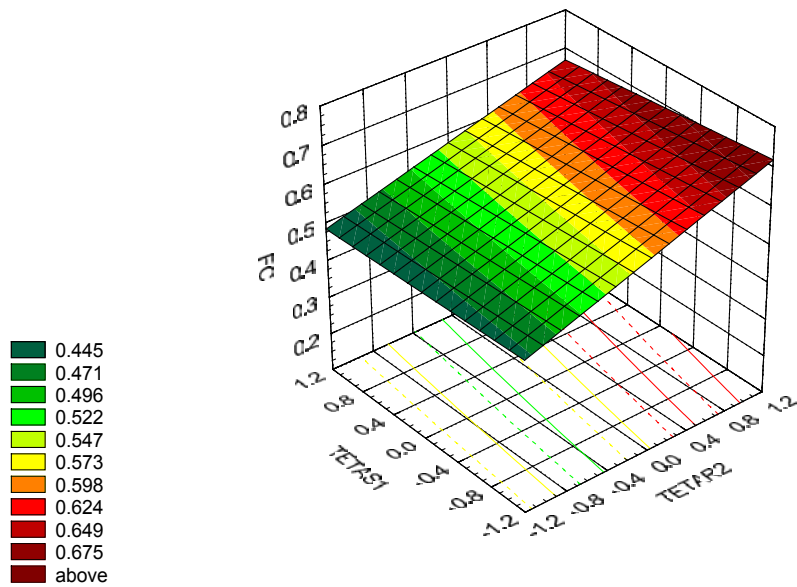


(b)

Figura 6.45: (a) Curva de FC em função θ_{r1} e ϵ_{r1} ($\theta_{r2} = +1$; $\theta_{s1} = +1$; $\epsilon_{r2} = +1$; $C_0 = -1$);
 (b) Curva de FC em função θ_{r1} e ϵ_{r2} ($\theta_{r2} = +1$; $\theta_{s1} = +1$; $\epsilon_{r1} = -1$; $C_0 = -1$).

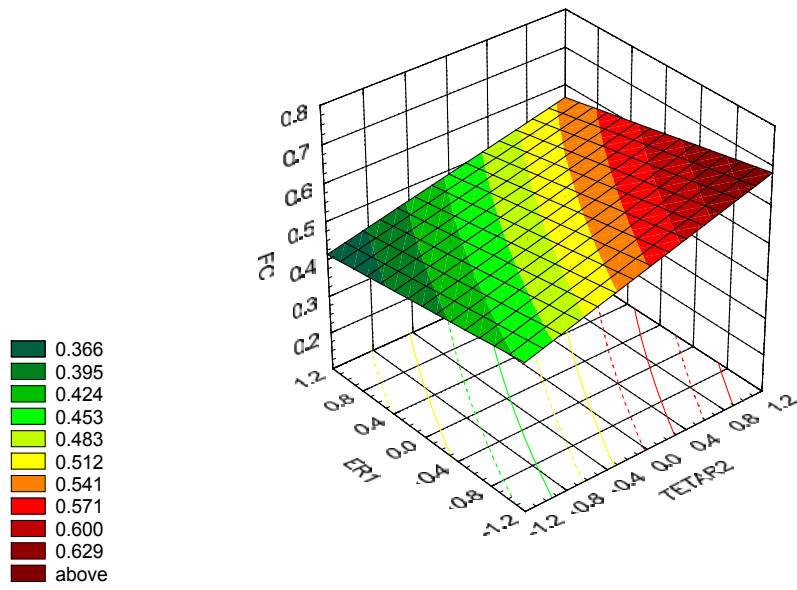


(a)

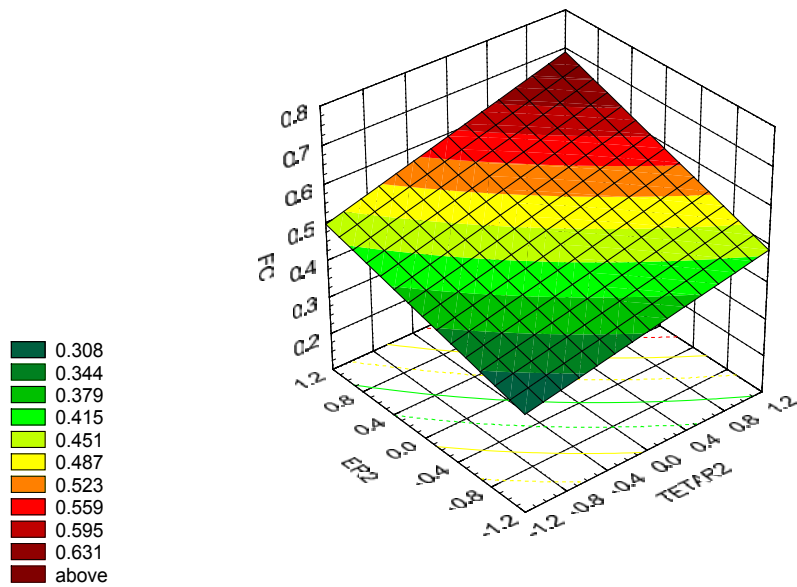


(b)

Figura 6.46: (a) Curva de FC em função θ_{r1} e C_0 ($\theta_{r2} = +1$; $\theta_{s1} = +1$; $\epsilon_{r1} = -1$; $\epsilon_{r2} = +1$)
 (b) Curva de FC em função θ_{r2} e θ_{s1} ($\theta_{r1} = -1$; $\epsilon_{r1} = -1$; $\epsilon_{r2} = +1$; $C_0 = -1$).



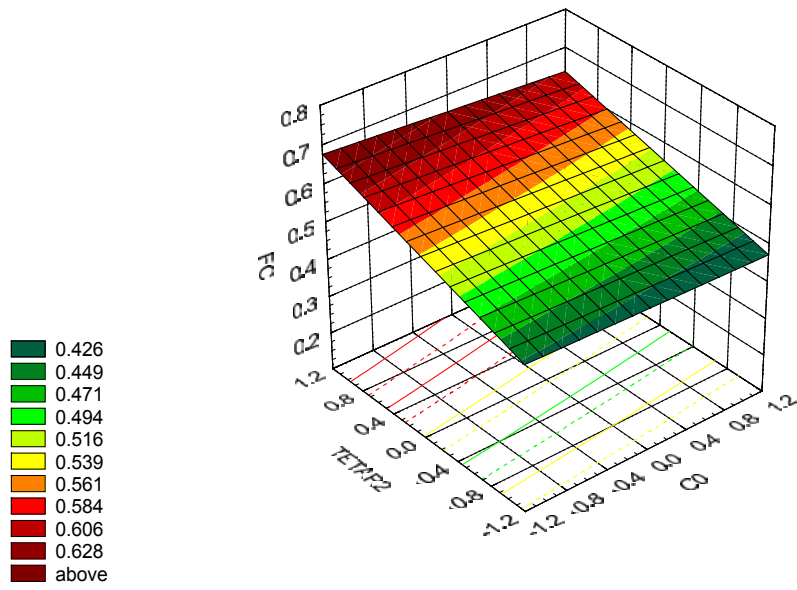
(a)



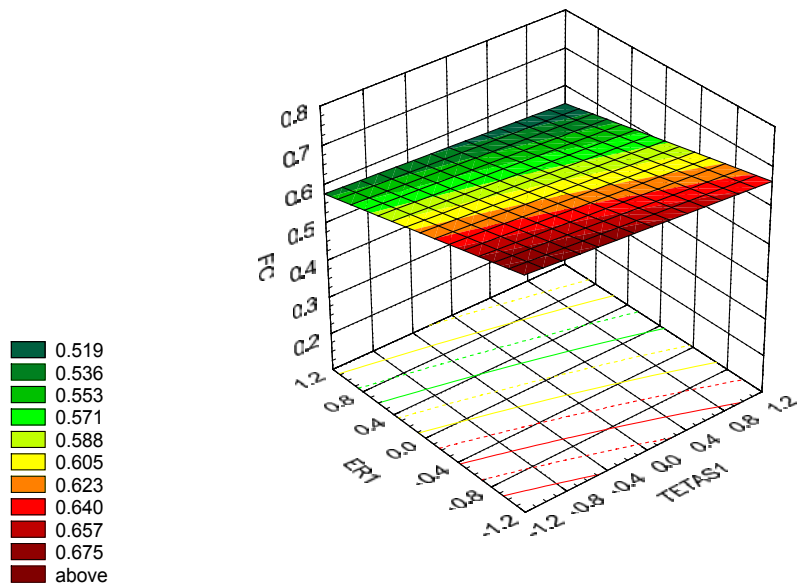
(b)

Figura 6.47: (a) Curva de FC em função θ_{r_2} e ϵ_{r_1} ($\theta_{r_1} = -1$; $\theta_{s_1} = +1$; $\epsilon_{r_2} = +1$; $C_0 = -1$).

(b) Curva de FC em função θ_{r_2} e ϵ_{r_2} ($\theta_{r_1} = -1$; $\theta_{s_1} = +1$; $\epsilon_{r_1} = -1$; $C_0 = -1$).

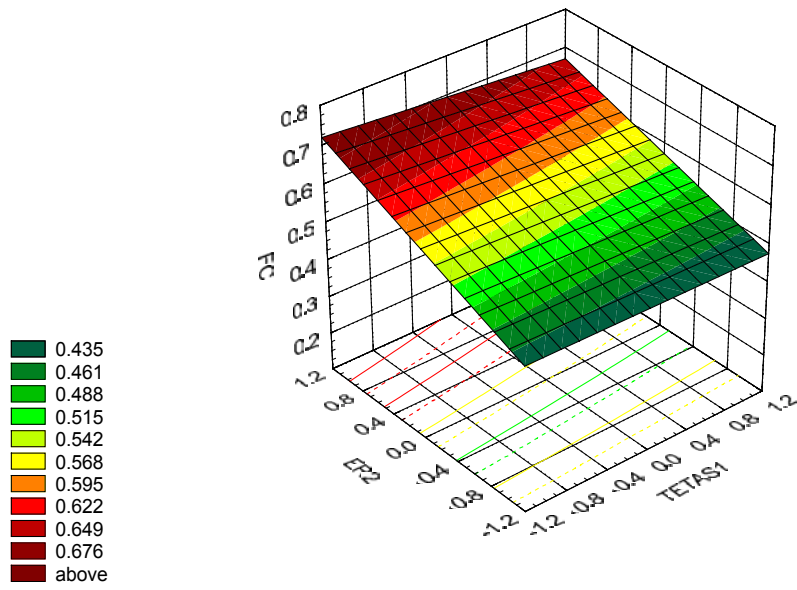


(a)

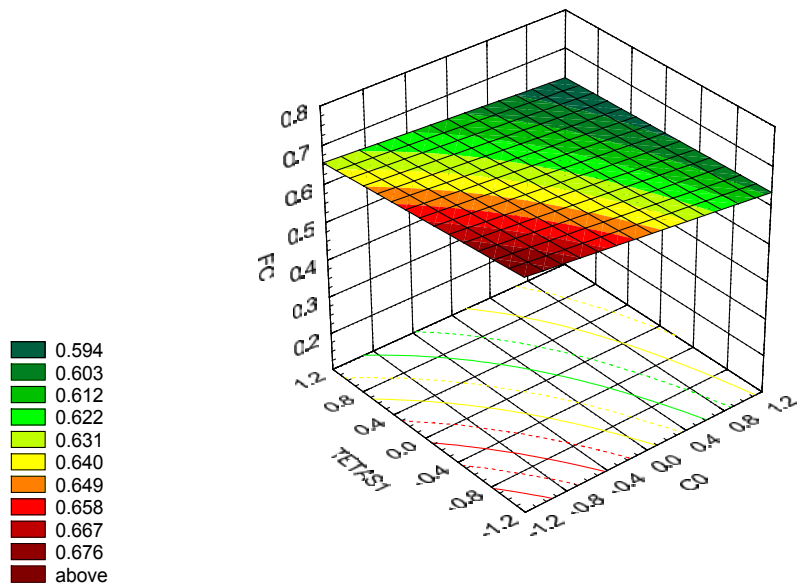


(b)

Figura 6.48: (a) Curva de FC em função θ_{r2} e C_0 ($\theta_{r1} = -1$; $\theta_{s1} = +1$; $\epsilon_{r1} = -1$; $\epsilon_{r2} = +1$);
 (b) Curva de FC em função θ_{s1} e ϵ_{r1} ($\theta_{r1} = -1$; $\theta_{r2} = +1$; $\epsilon_{r2} = +1$; $C_0 = -1$).

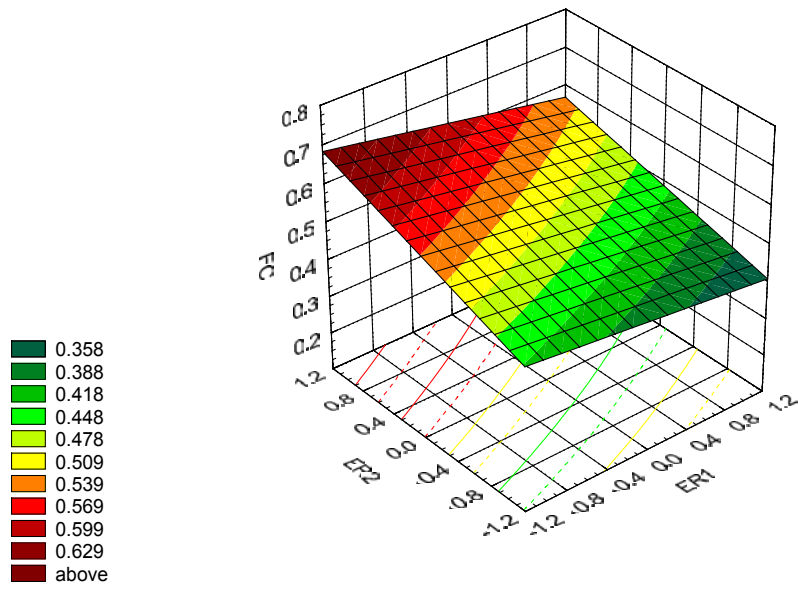


(a)

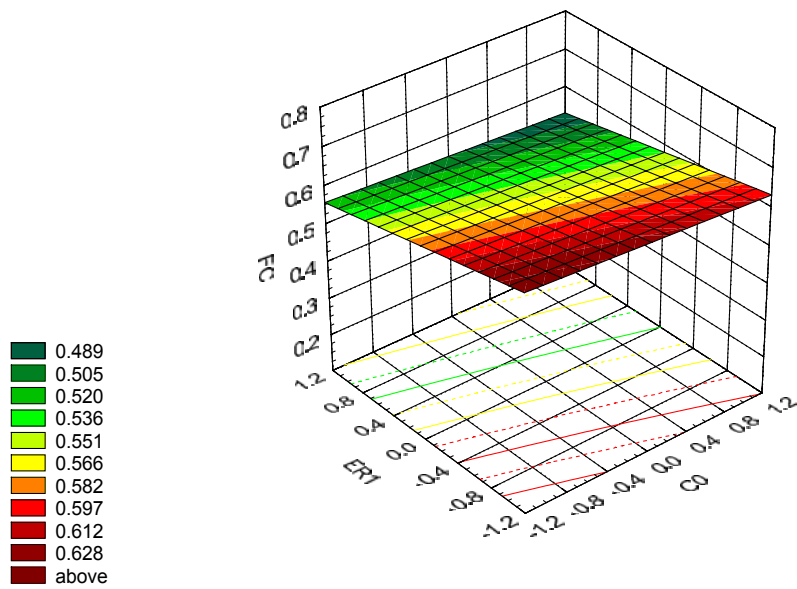


(b)

Figura 6.49: (a) Curva de FC em função θ_{s1} e ϵ_{r2} ($\theta_{r1} = -1$; $\theta_{r2} = +1$; $\epsilon_{r1} = -1$; $C_0 = -1$);
 (b) Curva de FC em função θ_{s1} e C_0 ($\theta_{r1} = -1$; $\theta_{r2} = +1$; $\epsilon_{r1} = -1$; $\epsilon_{r2} = +1$).

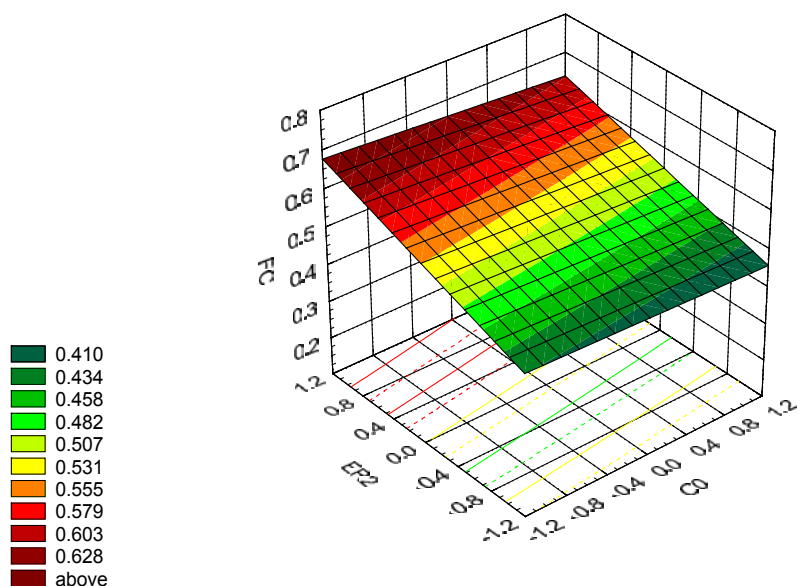


(a)



(b)

Figura 6.50: (a) Curva de FC em função ϵ_{r1} e ϵ_{r2} ($\theta_{r1} = -1$; $\theta_{r2} = +1$; $\theta_{s1} = +1$; $C_0 = -1$);
 (b) Curva de FC em função ϵ_{r1} e C_0 ($\theta_{r1} = -1$; $\theta_{r2} = +1$; $\theta_{s1} = +1$; $\epsilon_{r2} = +1$).



(a)

Figura 6.51: (a) Curva de FC em função ε_{r2} e C_0 ($\theta_{r1} = -1$; $\theta_{r2} = +1$; $\theta_{s1} = +1$; $\varepsilon_{r1} = -1$).

A Tabela 6.33 apresenta os valores para as variáveis independentes que maximizam o fator de concentração.

Tabela 6.33: Intervalos das variáveis que otimizam o fator de concentração.

Variáveis	Intervalo
θ_{r1} (min)	63,0 – 68,0
θ_{r2} (min)	30,6 – 36,7
θ_{s1} (min)	101,1 – 111,2
ε_{r1} (-)	0,77 – 0,86
ε_{r2} (-)	0,60 – 0,72
C_0 (g/L)	0,075 – 0,100

Comparando-se a Tabela 6.33 com a Tabela 4.2, pode-se afirmar que: para se obter fatores de concentração mais altos deve-se trabalhar no limite -1 de θ_{r1} bem como para a variável ε_{r1} . Já para a variável θ_{s1} , pode-se trabalhar próximo ao limite superior (+1). Para a variável θ_{r2} , também tem-se melhores fatores de concentração para o limite +1. Já para ε_{r2} , o fator de concentração é maximizado para próximo ao limite +1. Por fim, a variável C_0 deve estar próximo do limite inferior (-1).

6.9.4 INFLUÊNCIA DAS VARIÁVEIS DO PROCESSO CONTÍNUO NO FATOR DE PURIFICAÇÃO

Uma análise foi feita para estudar os efeitos que cada variável (C_0 , θ_{r1} , θ_{r2} , θ_{s1} , ϵ_{r1} e ϵ_{r2}) apresentam no fator de purificação. Na Figura 6.52 estão apresentados os efeitos dessas variáveis no parâmetro fator de purificação calculados pelo *software* Statistica 5.0.

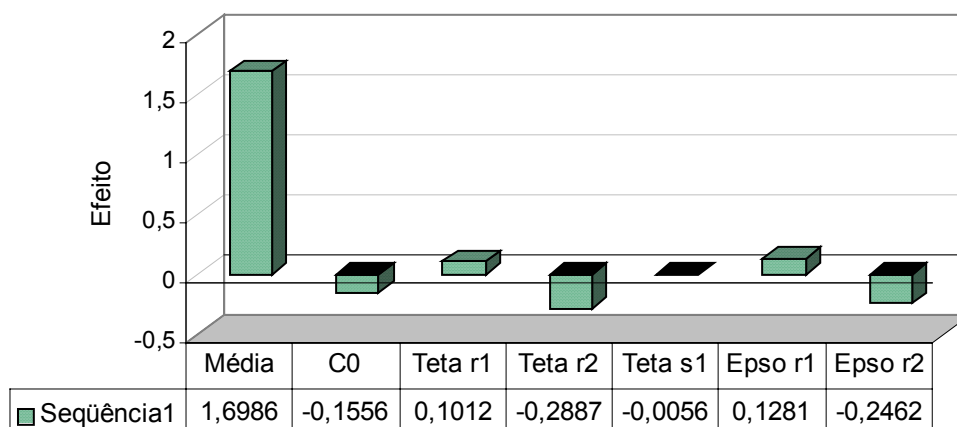


Figura 6.52: Curva representativa dos efeitos das principais variáveis do processo contínuo no estudo do parâmetro fator de purificação.

A Figura 6.52 mostra quais variáveis exercem maior e menor influência na determinação do fator de purificação. Pode-se observar que a variável com menor efeito é o tempo de residência dos sólidos no primeiro reator e a com maior efeito são duas: o tempo de residência do segundo reator e a fração de líquido do segundo reator, embora as demais também tenham efeitos próximos. O *software* citado fornece ainda os efeitos das interações entre essas variáveis. A relação completa dos efeitos significativos calculados podem ser observados na Tabela B.3 do Apêndice B.

Continuando a análise, o *software* Statistica 5.0 forneceu, por ajuste não linear, o modelo de 1ª ordem ajustado para a matriz de planejamento utilizada. Esse modelo está representado na Equação 55:

$$\begin{aligned}
 FP = & 1,6986 - 0,0778.C_0 + 0,0506.\theta_{r_1} - 0,1444.\theta_{r_2} - 0,0028.\theta_{s_1} + 0,0641.\varepsilon_{r_1} - 0,1231.\varepsilon_{r_2} \\
 & - 0,0250.C_0.\theta_{r_1} - 0,0037.C_0.\theta_{r_2} + 0,0222.C_0.\theta_{s_1} - 0,0066.\theta_{r_1}.\theta_{r_2} - 0,0175.\theta_{r_1}.\theta_{s_1} + \\
 & 0,0019.\theta_{r_1}.\varepsilon_{r_1} - 0,0047.\theta_{r_1}.\varepsilon_{r_2} + 0,0181.\theta_{r_2}.\theta_{s_1} + 0,0106.\theta_{r_2}.\varepsilon_{r_1} - 0,0222.\theta_{r_2}.\varepsilon_{r_2} - \\
 & 0,0078.\theta_{s_1}.\varepsilon_{r_1} + 0,0162.\theta_{s_1}.\varepsilon_{r_2} + 0,0119.\varepsilon_{r_1}.\varepsilon_{r_2} + 0,0087.C_0.\theta_{r_1}.\theta_{s_1} + \\
 & 0,0016.C_0.\theta_{r_2}.\varepsilon_{r_2} + 0,0047.\theta_{r_1}.\theta_{r_2}.\theta_{s_1} - 0,0025.\theta_{r_1}.\theta_{r_2}.\varepsilon_{r_2} + 0,0022.\theta_{r_1}.\theta_{s_1}.\varepsilon_{r_2} + \\
 & 0,0016.\theta_{r_1}.\varepsilon_{r_1}.\varepsilon_{r_2} - 0,0019.\theta_{r_2}.\theta_{s_1}.\varepsilon_{r_1} + 0,0041.\theta_{r_2}.\theta_{s_1}.\varepsilon_{r_2} - 0,0025.\theta_{s_1}.\varepsilon_{r_1}.\varepsilon_{r_2} \quad (55)
 \end{aligned}$$

A análise estatística para o modelo apresentado na Equação 55 foi obtida a partir dos dados apresentados na Tabela 6.34.

Tabela 6.34: Análise de variância para ajuste do modelo linear para FP.

	Soma Quadrática (SQ)	Graus de liberdade	Média Quadrática (MQ)
Regressão (R)	3,314	28 (p-1)	0,118
Resíduo (r)	$1,844.10^{-3}$	36 (n-p)	$5,122.10^{-5}$
Falta de ajuste	$1,844.10^{-3}$	36 (m-p)	$5,122.10^{-5}$
Total (SQ _R + SQ _r)	3,316	64	

p: número de parâmetros do modelo

n: número de ensaios

m: número distinto

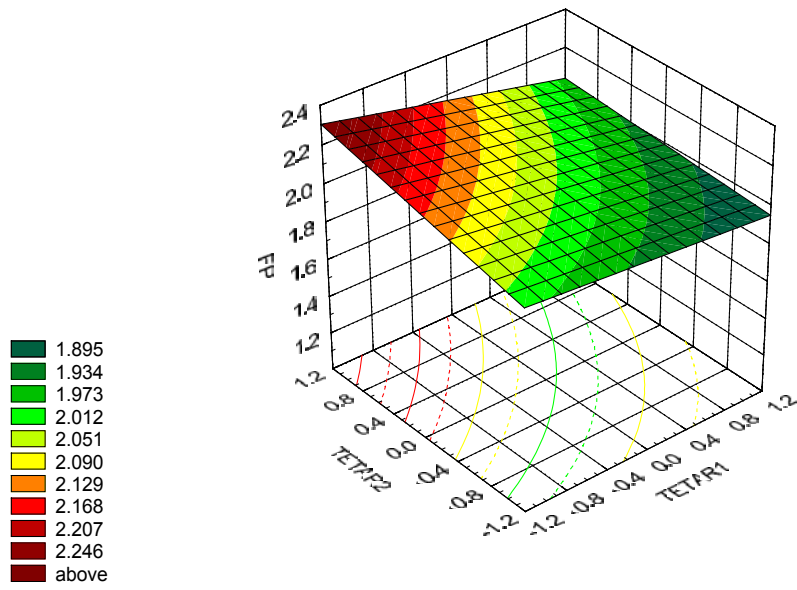
Coefficiente de correlação = 0,999 (SQ_R/SQ_{total})

Teste de F: Calculado $F_{28,36} = 2310,53$ (MQ_R/MQ_r)

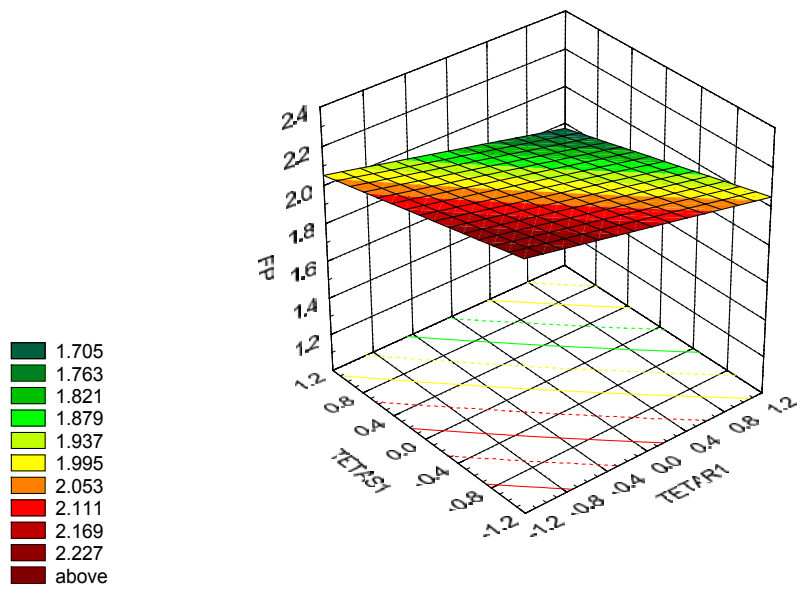
Tabelado $F_{28,36} \sim 1,74$ (95% de confiança)

De acordo com os resultados obtidos com o teste de F, os ensaios estão bem representados pelo modelo de primeira ordem. Verifica-se também que o coeficiente de correlação está bem próximo do valor 1 mostrando que o modelo foi ajustado satisfatoriamente aos pontos da matriz de planejamento.

Para visualizar o comportamento da variável FP frente as variáveis utilizadas para o estudo, combinadas de duas em duas, fez-se as curvas apresentadas nas Figuras de 6.53 a 6.60.

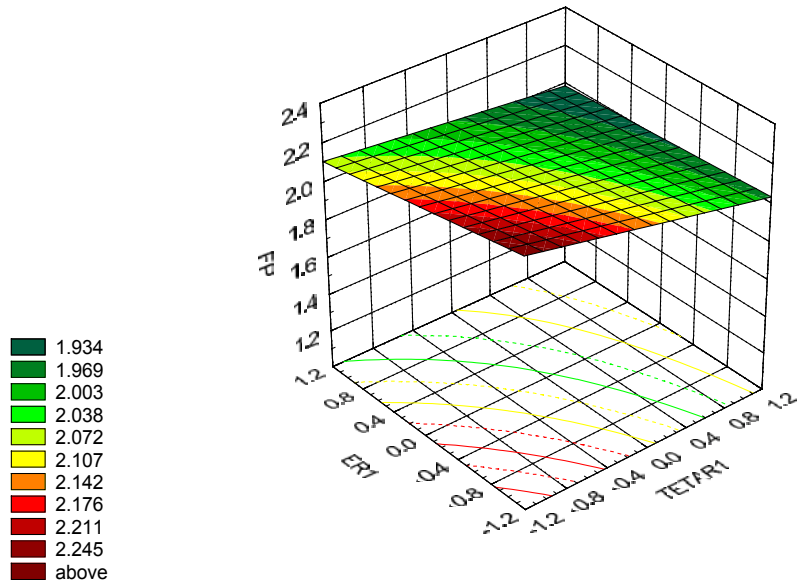


(a)

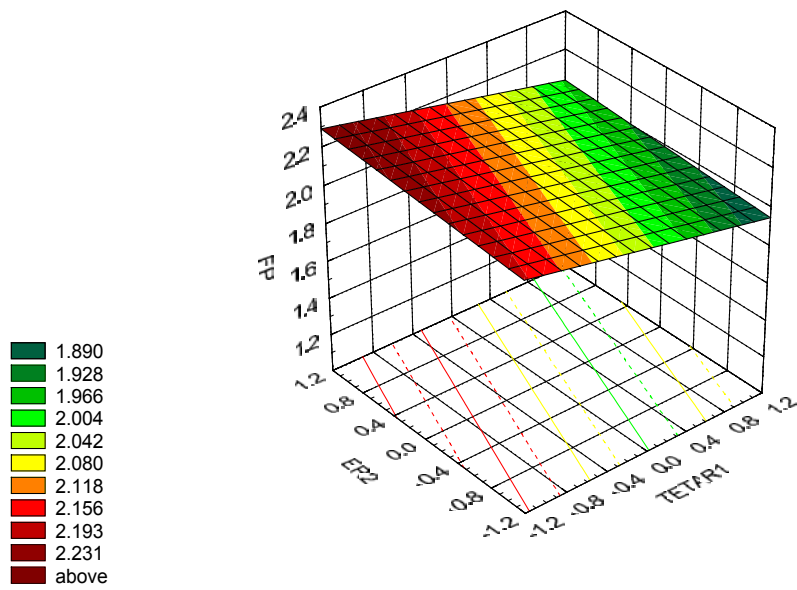


(b)

Figura 6.53: (a) Curva de FP em função θ_{r1} e θ_{r2} ($\theta_{s1} = -1$; $\epsilon_{r1} = -1$; $\epsilon_{r2} = +1$; $C_0 = -1$);
 (b) Curva de FP em função θ_{r1} e θ_{s1} ($\theta_{r2} = +1$; $\epsilon_{r1} = -1$; $\epsilon_{r2} = +1$; $C_0 = -1$).

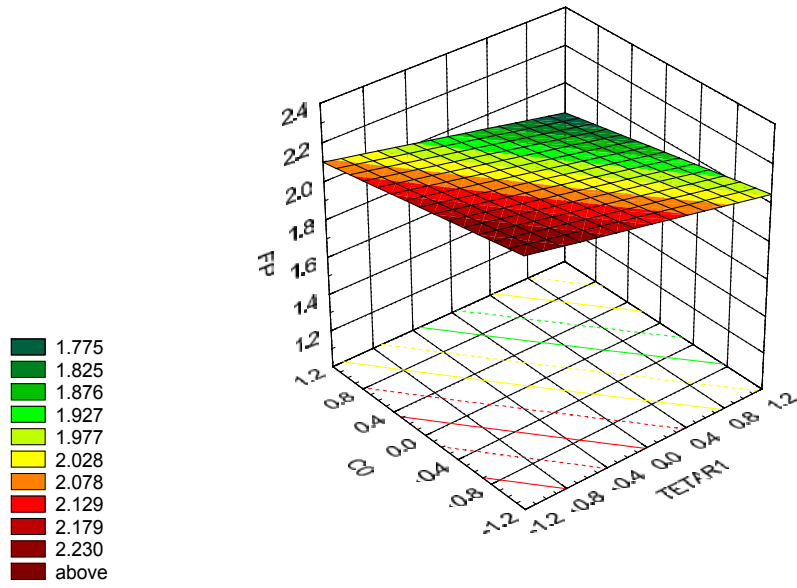


(a)

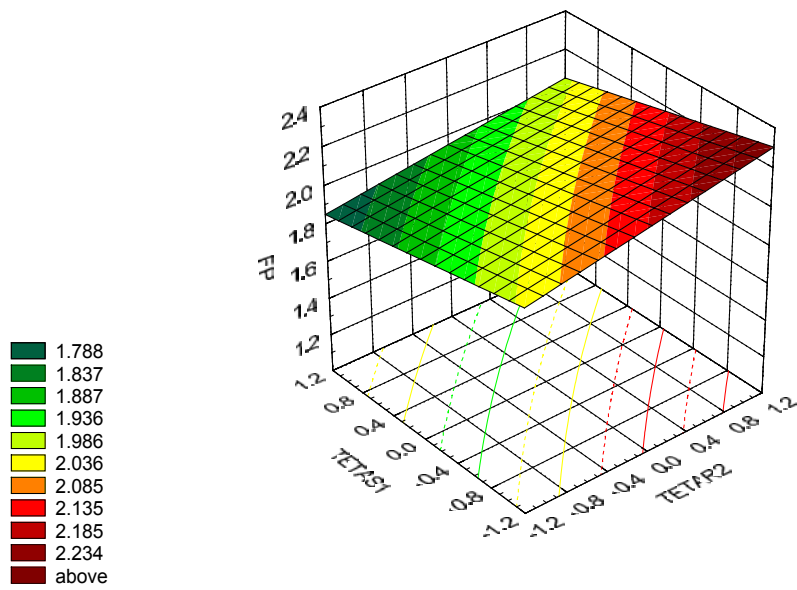


(b)

Figura 6.54: (a) Curva de FP em função θ_{r1} e ϵ_{r1} ($\theta_{r2} = +1$; $\theta_{s1} = -1$; $\epsilon_{r2} = +1$; $C_0 = -1$);
 (b) Curva de FP em função θ_{r1} e ϵ_{r2} ($\theta_{r2} = +1$; $\theta_{s1} = -1$; $\epsilon_{r1} = -1$; $C_0 = -1$).

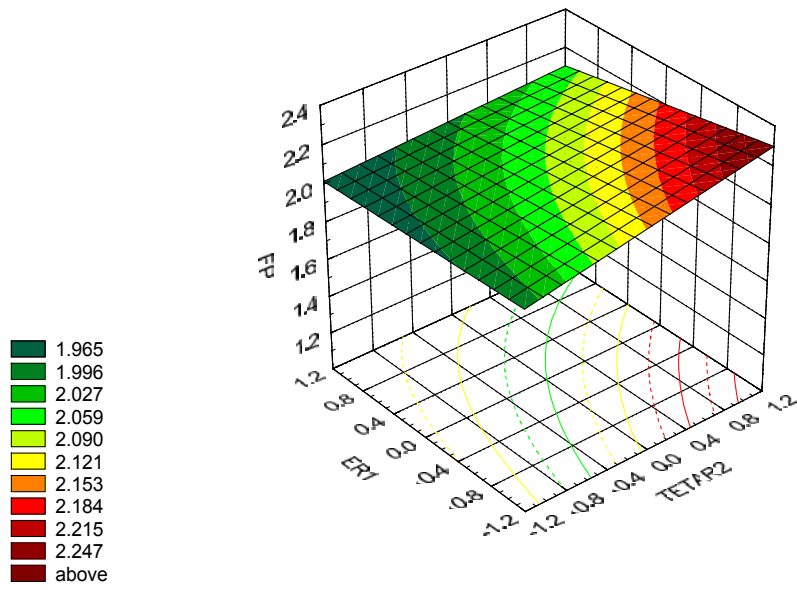


(a)

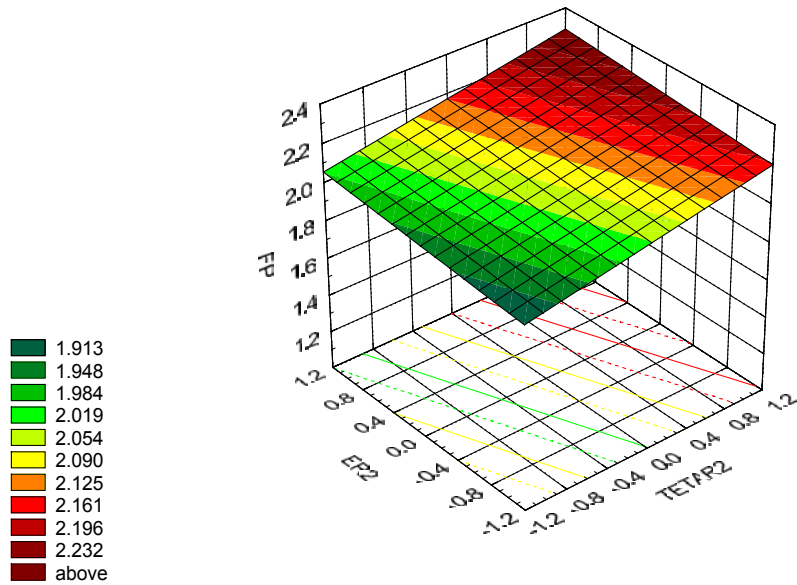


(b)

Figura 6.55: (a) Curva de FP em função θ_{r1} e C_0 ($\theta_{r2} = +1$; $\theta_{s1} = -1$; $\epsilon_{r1} = -1$; $\epsilon_{r2} = +1$)
 (b) Curva de FP em função θ_{r2} e θ_{s1} ($\theta_{r1} = +1$; $\epsilon_{r1} = -1$; $\epsilon_{r2} = +1$; $C_0 = -1$).

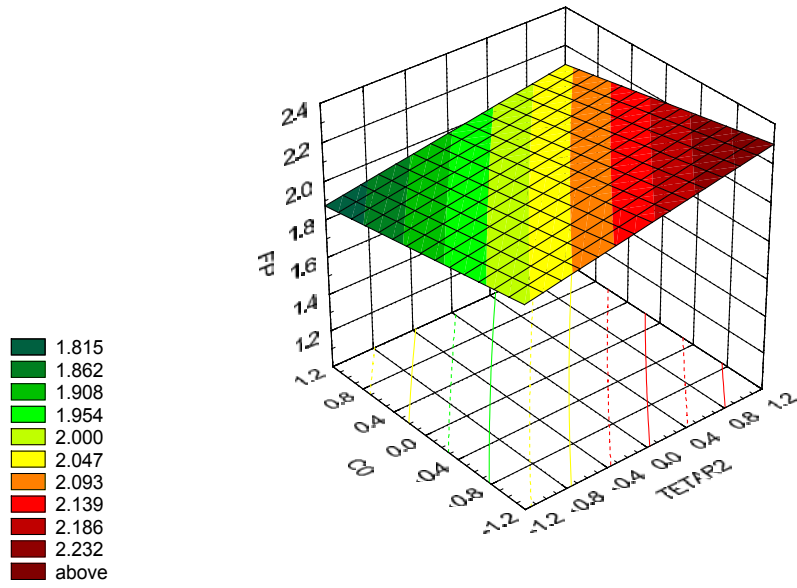


(a)

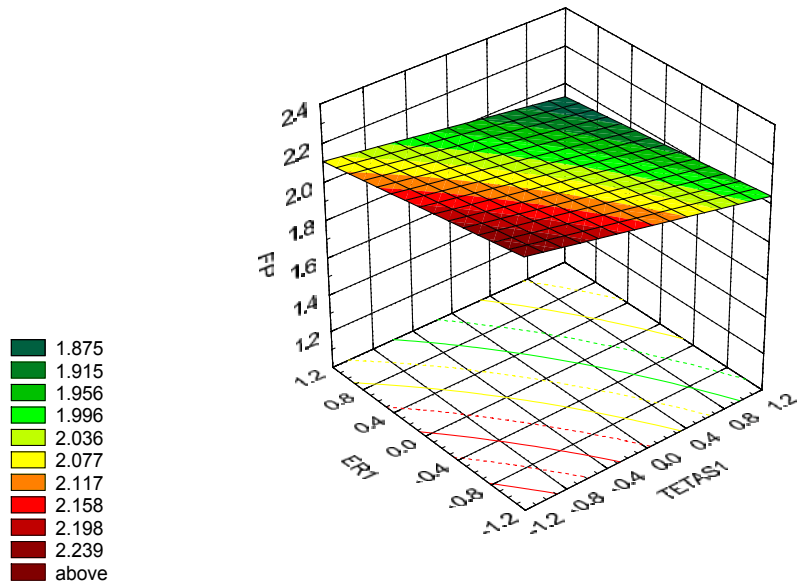


(b)

Figura 6.56: (a) Curva de FP em função θ_{r_2} e ϵ_{r_1} ($\theta_{r_1} = +1$; $\theta_{s_1} = -1$; $\epsilon_{r_2} = +1$; $C_0 = -1$).
 (b) Curva de FP em função θ_{r_2} e ϵ_{r_2} ($\theta_{r_1} = +1$; $\theta_{s_1} = -1$; $\epsilon_{r_1} = -1$; $C_0 = -1$).

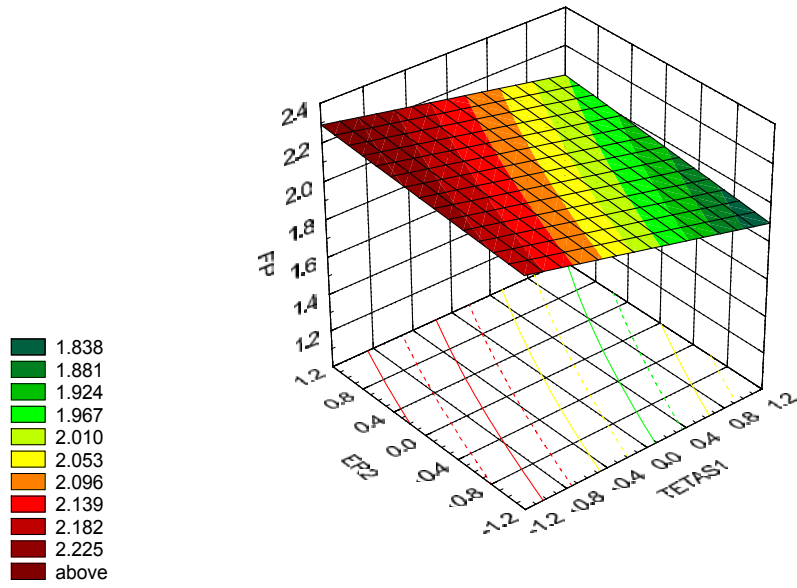


(a)

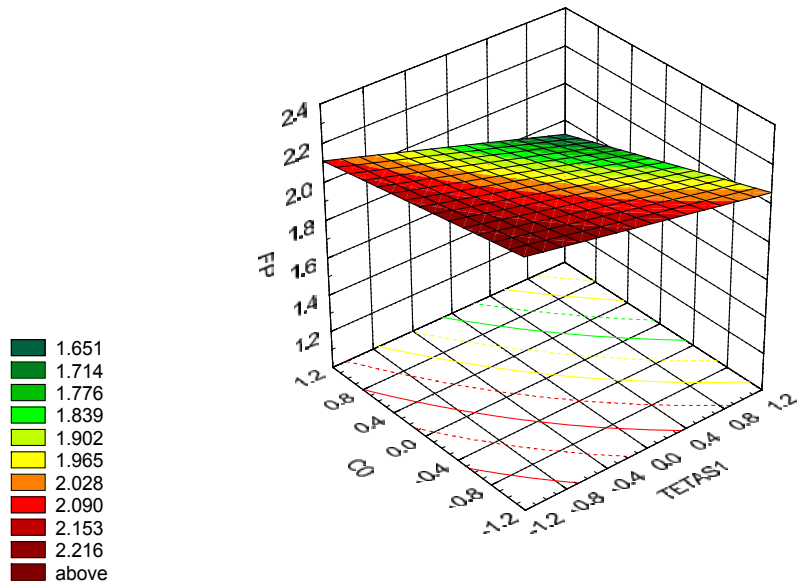


(b)

Figura 6.57: (a) Curva de FP em função θ_{r_2} e C_0 ($\theta_{r_1} = +1$; $\theta_{s_1} = -1$; $\epsilon_{r_1} = -1$; $\epsilon_{r_2} = +1$);
 (b) Curva de FP em função θ_{s_1} e ϵ_{r_1} ($\theta_{r_1} = +1$; $\theta_{r_2} = +1$; $\epsilon_{r_2} = +1$; $C_0 = -1$).

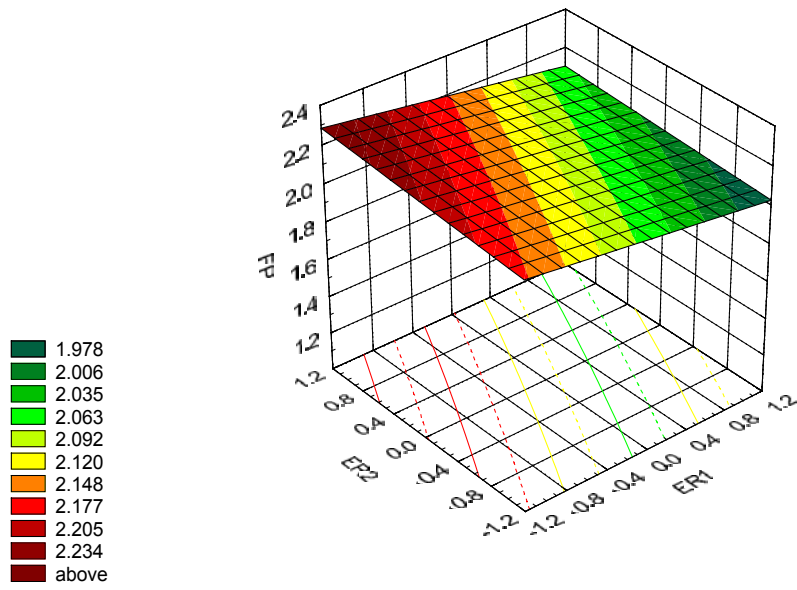


(a)

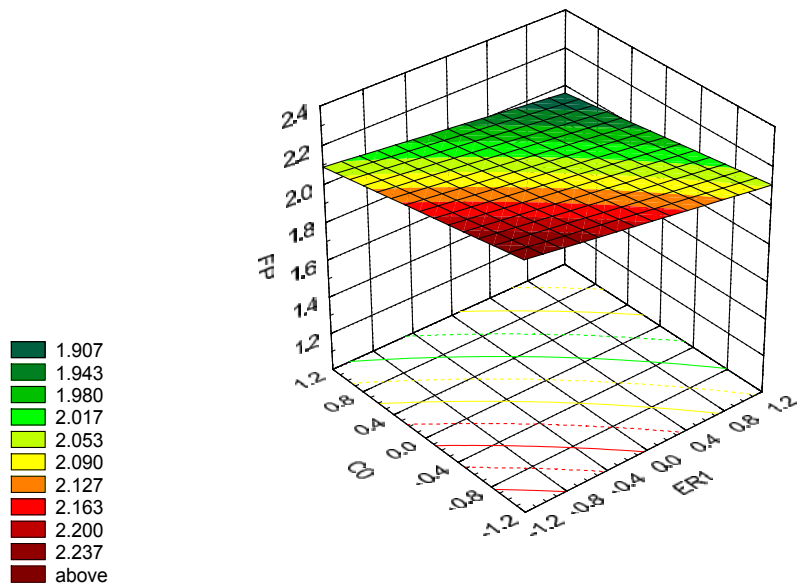


(b)

Figura 6.58: (a) Curva de FP em função θ_{s1} e ϵ_{r2} ($\theta_{r1} = +1$; $\theta_{r2} = +1$; $\epsilon_{r1} = -1$; $C_0 = -1$);
 (b) Curva de FP em função θ_{s1} e C_0 ($\theta_{r1} = +1$; $\theta_{r2} = +1$; $\epsilon_{r1} = -1$; $\epsilon_{r2} = +1$).

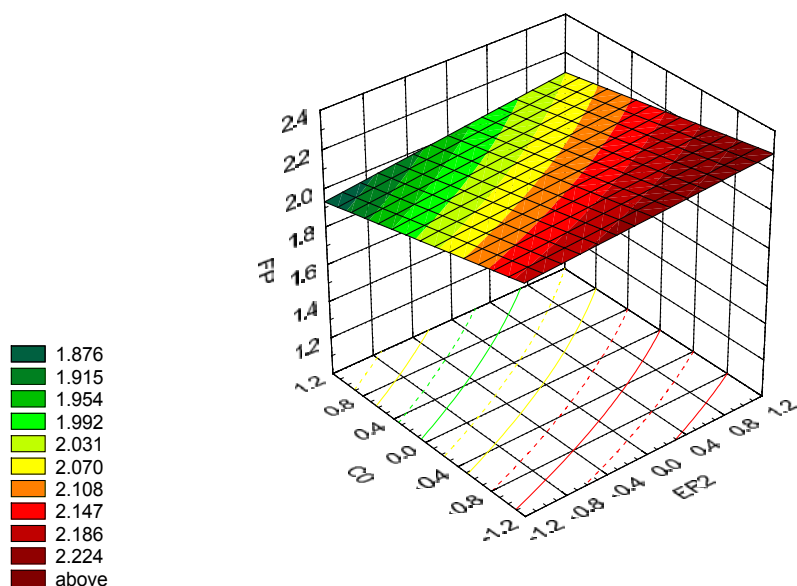


(a)



(b)

Figura 6.59: (a) Curva de FP em função ϵ_{r1} e ϵ_{r2} ($\theta_{r1} = +1$; $\theta_{r2} = +1$; $\theta_{s1} = -1$; $C_0 = -1$);
 (b) Curva de FP em função ϵ_{r1} e C_0 ($\theta_{r1} = +1$; $\theta_{r2} = +1$; $\theta_{s1} = -1$; $\epsilon_{r2} = +1$).



(a)

Figura 6.60: (a) Curva de Y em função ε_2 e C_0 ($\theta_{r1} = +1$; $\theta_{r2} = +1$; $\theta_{s1} = -1$; $\varepsilon_1 = -1$).

A Tabela 6.35 apresenta os valores para as variáveis independentes que maximizam o fator de purificação.

Tabela 6.35: Intervalos das variáveis que otimizam o fator de purificação.

Variáveis	Intervalo
θ_{r1} (min)	68,0 – 73,0
θ_{r2} (min)	24,5 – 30,6
θ_{s1} (min)	91,0 – 101,1
ε_{r1} (-)	0,86 – 0,95
ε_{r2} (-)	0,48 – 0,60
C_0 (g/L)	0,075 – 0,100

Comparando-se a Tabela 6.35 com a Tabela 4.2, pode-se afirmar que: para se obter fatores de purificação mais altos deve-se trabalhar no limite +1 de θ_{r1} e no limite -1 para variável θ_{r2} . Para a variável θ_{s1} , pode-se trabalhar próximo ao limite inferior (-1). Para a variável ε_{r1} , também tem-se melhores fatores de purificação para o limite +1. Já para ε_{r2} , o fator de purificação é maximizado para próximo do limite -1. Por fim, para variável C_0 deve-se trabalhar próximo ao limite inferior (-1).

Procurando-se otimizar os três fatores, Y, FC e FP ao mesmo tempo foi necessário fazer um cruzamento entre os dados das Tabelas 6.31, 6.33 e 6.35 para que se possa conhecer o valor de cada variável que deverá ser utilizado na prática. Esses valores estão mostrados na Tabela 6.36.

Tabela 6.36: Valores ótimos obtidos para operação do sistema contínuo que maximizam Y, FC e FP.

Variáveis	Valor
θ_{r1} (min)	68,0
θ_{r2} (min)	30,6
θ_{s1} (min)	101,1
ε_{r1} (-)	0,86
ε_{r2} (-)	0,60
C_0 (g/L)	0,075

Algumas variáveis têm efeitos opostos para os parâmetros Y, FC e FP, portanto foi necessário colocar o ponto central como valor a ser utilizado para não maximizar um parâmetro em detrimento de outro. Isso mostra que, na prática, já se estava trabalhando próximo das condições ótimas uma vez que o ponto central foi obtido de um ensaio contínuo realizado.

6.9.5 VALIDAÇÃO DO PROCESSO DE OTIMIZAÇÃO DO RENDIMENTO

Neste item são apresentados os resultados obtidos para a simulação e os resultados experimentais do processo contínuo de adsorção do ácido clavulânico na resina Amberlite IRA 400-Cl. Esse ensaio foi realizado com o objetivo de validar os resultados da otimização do processo apenas para o rendimento, mostrando que a técnica de análise de superfície de resposta foi satisfatória. A modelagem matemática para o processo contínuo está apresentada no item 5.3.

Para as simulações escolheram-se valores para a fração de líquido em cada estágio (ε_r), concentração inicial de AC (C_0), tempos de residência do reator e de sólidos com base nos valores da Tabela 6.31. Esses parâmetros estão apresentados na Tabela 6.37.

Tabela 6.37: Parâmetros utilizados na simulação e no ensaio.

Ensaio	C_0 g.L ⁻¹	θ_{r1} Min	θ_{r2} min	θ_{s1} min	θ_{s2} min	ε_{r1} (-)	ε_{r2} (-)	V_1 mL	V_2 mL
1	0,075	73,0	24,5	91,0	47,1	0,86	0,72	200	90

As vazões de operação estão apresentadas na Tabela 6.38 e foram calculadas utilizando-se as Equações de 20, 21 e 22 e aplicando-se a essas Equações os valores da Tabela 6.37.

Tabela 6.38: Condições de operação do ensaio contínuo.

Ensaio	F_1 (mL/min)	F_2 (mL/min)	F_r (mL/min)
1	0,54	1,83	2,55

Os parâmetros de transporte (D_{ef} e k_s) e os parâmetros cinéticos (k_1 , k_2 , k_3) utilizados nas simulações foram obtidos no estudo cinético em tanque agitado em batelada. O ensaio com dados experimentais e simulados está representado na Figura 6.61 e 6.62 para etapa de adsorção e dessorção, respectivamente.

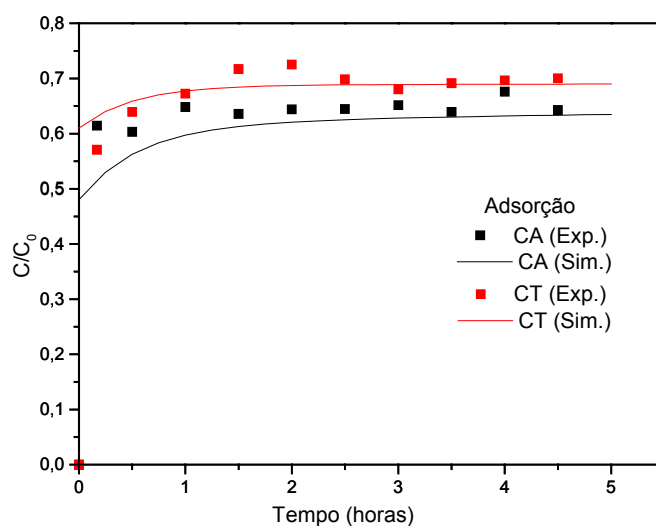


Figura 6.61: Resultados simulados e experimentais do processo contínuo de adsorção de AC. Etapa de adsorção.

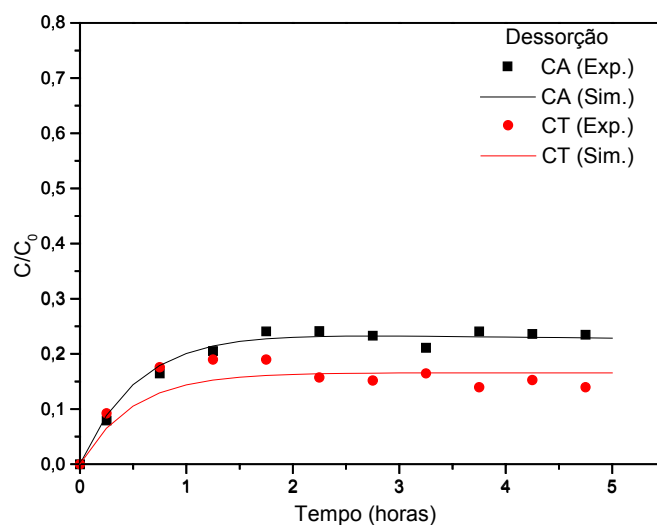


Figura 6.62: Resultados simulados e experimentais do processo contínuo de adsorção de AC. Etapa de dessorção.

Nas Figuras 6.61 e 6.62 é possível observar que o modelo explicou bem aos dados experimentais tanto para a concentração de AC como para a concentração de contaminantes. Os parâmetros Y , FP e FC foram calculados para os ensaios experimentais e estão mostrados na Tabela 6.39, juntamente com esses mesmos parâmetros obtidos na simulação e a diferença entre os valores experimentais e simulados.

Tabela 6.39: Resultados experimentais e simulados de rendimento (Y), fator de purificação (FP) e fator de concentração (FC) e a diferença entre os resultados experimentais e simulados (e).

Ensaio	Y (%)			FP (-)			FC (-)		
	Exp	Sim	e (%)	Exp	Sim	e (%)	Exp	Sim	e (%)
1	98,8	100,0	1,2%	1,75	1,87	6%	0,236	0,265	10,9%

Pelos resultados da Tabela 6.39 observa-se que o modelo previu os parâmetros com um erro menor que 11% para o resultado do fator de concentração, fator de purificação e para o rendimento. Esse resultado foi considerado bom uma vez que o FP é um parâmetro difícil de se prever. Os parâmetros utilizados realmente maximizaram o rendimento chegando próximo a 100%.

Os problemas operacionais do processo contínuo foram solucionados, principalmente aquele que se refere ao reciclo de líquido e de resina. Nesse caso foi utilizada uma mangueira de maior diâmetro para que não ocorresse o entupimento da mesma. No entanto, como a vazão de reciclo é baixa para a mangueira e o rotor utilizado na bomba peristáltica de laboratório, optou-se por utilizar uma vazão de reciclo maior, porém com a bomba operando em regime intermitente para compensar a diferença entre a vazão de reciclo desejada e a vazão utilizada.

6.10 COMPARAÇÃO ENTRE PROCESSO CONTÍNUO E PROCESSO LEITO FIXO

Para se comparar o processo de adsorção contínuo com o processo em leito fixo utilizou-se os dados obtidos por Almeida et al. (2003b) de adsorção de AC em coluna de leito fixo com a resina Amberlite IRA 400-Cl. Esses dados estão descritos na Tabela 6.39.

Tabela 6.40: Condições de operação e resultados dos experimentos em leito fixo (Almeida et al. 2003b).

Ensaio	Vazão (mL/min)	Temperatura (°C)	pH (-)	FC (-)	FP (-)
1	3,95	10	7,0	0,43	4,81
2	3,98	20	7,0	0,48	3,96
3	4,00	30	7,0	0,43	7,57
4	4,20	30	6,2	0,53	7,30

Pelos resultados da Tabela 6.40 pode-se observar que o aumento de temperatura de 10 para 30°C aumenta o fator de purificação, porém deixa o FC constante, em compensação, como já foi mencionado, temperaturas altas aumentam a velocidade de degradação do antibiótico, ocasionando perdas de produto durante o processo. Já a diminuição do pH de 7,0 para 6,2, pH em que o antibiótico é mais estável, aumenta o fator de concentração, mas não melhora o fator de purificação. Observando esses resultados pode-se concluir que para esse processo, dentro das condições estudadas, é mais vantajoso trabalhar com pH 6,2 e temperaturas mais amenas, em torno de 10 a

20°C, diminuindo a degradação do antibiótico. Para comprovar essa afirmação foi feito um ensaio com pH 6,2 e temperatura 20°C com vazão de 7,5 mL/min, e obteve-se um FC de 0,50 e FP de 6,93.

Ainda na Tabela 6.39 observa-se que o processo em leito fixo, assim como o processo contínuo, não consegue concentrar o ácido clavulânico uma vez que para todos os ensaios o FC foi menor que 1. O processo em leito fixo conseguiu obter fatores de purificação bem maiores que o processo contínuo. O processo contínuo ainda necessita de atenção para se determinar algumas melhorias operacionais e de configuração. Porém, não se pode compará-lo diretamente com o processo em leito fixo, pois este utiliza maior quantidade de resina e a quantidade de solução purificada é menor que no processo contínuo.

7 CONCLUSÕES

7.1 ESTUDO DE DEGRADAÇÃO

O ácido clavulânico tem maior estabilidade em pH 6,2 que em pH 7,0 tanto para resultados obtidos de ensaios em solução aquosa quanto em ensaios *in vitro* e esses resultados são independentes da fonte de AC, puro ou proveniente de fermentação. No caso do AC.1 e AC.2 essa maior estabilidade em pH 6,2 foi mais visível em temperaturas acima de 10°C. Em temperaturas abaixo de 0°C, -8°C e 5°C para AC.1, AC.2 e AC.3, respectivamente, a estabilidade com relação ao pH tem efeito oposto, ou seja, é maior em pH 7,0 que em pH 6,2. Esse fato foi observado quando utilizou-se a Equação de Arrhenius para determinar a dependência da constante de degradação com a temperatura. Essa dependência de k com a temperatura foi um importante resultado obtido neste trabalho, uma vez que utilizando-se essas relações pode-se extrapolar outros resultados para constante de degradação em outras temperaturas baseando-se em condições utilizadas nos processo de produção e purificação do ácido clavulânico.

As constantes de degradação do ácido clavulânico em solução aquosa são menores que aquelas obtidas nos ensaios *in vitro* em todas as temperaturas e pHs estudados. Esse fato ocorreu provavelmente devido à presença de outros componentes do meio de fermentação, que provocam o aumento da instabilidade do antibiótico. Através dos resultados obtidos para o estudo de degradação do AC avaliou-se que as melhores condições de temperatura e pH a serem utilizadas no processo de recuperação desse antibiótico foram pH 6,2 e temperaturas amenas entre 10 e 20°C.

7.2 ESTUDO DE ADSORÇÃO E DESSORÇÃO EM BATELADA

Nos estudos das cinéticas de adsorção e dessorção do ácido clavulânico puro verificou-se que o melhor adsorvente para se utilizar foi a resina de troca iônica

Amberlite IRA 400 carregada com íons cloreto. Essa resina apresentou capacidade para extrair ácido clavulânico sem aumentar a degradação do antibiótico, já que o pH fica constante durante todo o ensaio.

Os fatores como concentração inicial de AC, fonte de AC e concentração de NaCl influenciaram no processo de adsorção, porém a influência da temperatura foi pequena. A variação de temperatura influenciou a constante de equilíbrio (K_D) e a dessorção do ácido clavulânico, pois o aumento daquela favoreceu o processo de dessorção. A presença de NaCl na etapa de adsorção é bastante prejudicial para o processo de adsorção de AC na resina IRA 400-Cl. A concentração de NaCl necessária para eluir o AC foi de 2%, com concentração de antibiótico em torno de 100 mg/L.

Nos estudos cinéticos de adsorção e dessorção do ácido clavulânico produzido por fermentação, pôde-se verificar que a resina Amberlite IRA 400-Cl extraiu cerca de 30% a menos de ácido clavulânico quando comparado com a extração desse antibiótico puro. Esse fato se deve possivelmente a presença de outros componentes no meio de fermentação que prejudicam a adsorção. Para o AC.3 também verificou-se que a concentração inicial de antibiótico influencia na adsorção, isso é devido a capacidade máxima da resina determinada nas isotermas. A temperatura e o pH pouco influenciaram na cinética, porém tiveram grande influência nas constantes de equilíbrio obtidas nas isotermas. As constantes de equilíbrio são influenciadas pela variação da temperatura. A diminuição do pH de 6,2 para 4,0 aumenta a constante de equilíbrio, independente da temperatura de adsorção. Pelos resultados apresentados as melhores condições de adsorção do ácido clavulânico são temperatura 10°C e pH 6,2, condições ótimas também para diminuir a velocidade de degradação do antibiótico.

7.3 MODELAGEM E SIMULAÇÃO

As cinéticas de adsorção e dessorção do AC na resina de troca iônica Amberlite IRA 400-Cl foram bem representadas pelo modelo matemático proposto. A modelagem permitiu a determinação de vários parâmetros importantes do processo tais como os parâmetros de transporte e as constantes cinéticas intrínsecas de adsorção e dessorção. Pela simulação do processo também foi possível concluir que o processo é limitado tanto pela etapa de adsorção quanto pela transferência de massa. É importante salientar que a literatura não considera o efeito da cinética de adsorção, pois baseia-se em

resultados obtidos para produtos de alto peso molecular (proteínas). Porém, no presente trabalho, evidenciou-se que, no caso de substâncias de baixo peso molecular, a cinética de adsorção intrínseca não pode ser desprezada.

Analisando-se as simulações para o AC puro concluiu-se que a temperatura mostrou ter um efeito significativo na constante de equilíbrio (K_D) e nas constantes cinéticas intrínsecas k_1 e k_3 .

A análise dos resultados das simulações para diferentes concentrações iniciais de AC também comprovaram que o processo é limitado tanto pela etapa de adsorção quanto pela transferência de massa e que o modelo mais uma vez ajustou-se bem aos dados experimentais. Os valores de D_{ef} são influenciados pela concentração inicial de AC. O mesmo fato foi observado por Mayer et al. (1997). Provavelmente o núcleo inerte nas partículas, cujo tamanho depende da concentração externa, afeta a razão R^2/D_{ef} que aparece no modelo

Também para o AC proveniente de fermentação o modelo utilizado na simulação do processo de adsorção de AC na resina estudada ajustou-se bem aos dados experimentais em todos os ensaios. Nestes casos a modelagem também permitiu a determinação dos parâmetros de transporte e das constantes cinéticas intrínsecas de adsorção e dessorção.

7.4 PROCESSO CONTÍNUO

Através da modelagem matemática adequada foi possível simular satisfatoriamente o processo de contínuo de adsorção do ácido clavulânico na resina utilizada. Porém, por ser um processo multi variável, buscou-se técnicas que possibilitaram sua otimização a fim de que fossem estabelecidas quais as condições de operação para maximizar o rendimento, fator de purificação e fator de concentração, visto que valores de variáveis que podem aumentar o rendimento acabam por piorar o fator de purificação e vice-versa.

Os ensaios do processo contínuo puderam ser realizados apesar de problemas operacionais devido ao reciclo de material sólido. O modelo previu os parâmetros rendimento e fatores de concentração e purificação com um erro entre 7 e 17%. Essas diferenças podem estar relacionadas com alguns problemas operacionais dos ensaios experimentais. O rendimento foi maior que os dados da literatura.

As simulações, tanto para o processo contínuo como para o processo em batelada em tanque agitado, descreveram bem o comportamento do processo de adsorção do ácido clavulânico, puro ou fermentado, na resina de troca iônica Amberlite IRA 400-Cl. Esses resultados mostram que os modelos propostos foram adequados para o processo.

7.5 OTIMIZAÇÃO DE PARÂMETROS

A técnica de análise de superfície de resposta utilizada para otimizar os parâmetros envolvidos no processo contínuo mostrou-se satisfatória determinando-se a influência dos parâmetros do processo no rendimento e nos fatores de concentração e purificação. Através desta análise foi possível determinar os valores dessas variáveis que poderiam maximizar Y, FC e FP. Fazendo-se um ensaio para validar esses valores obteve-se um erro menor que 11% para esses parâmetros, considerando-se um bom valor visto que o processo contínuo é relativamente complexo operacionalmente.

Os problemas operacionais do processo contínuo foram solucionados, principalmente aquele que se refere ao reciclo de líquido e de resina, optando-se por utilizar uma vazão de reciclo maior, porém com a bomba peristáltica operando em regime intermitente para compensar a diferença entre a vazão de reciclo desejada e a vazão utilizada. Porém, para um projeto de ampliação de escala, onde os volumes de líquido e resina seriam muito maiores, os problemas operacionais aumentariam na mesma proporção.

7.6 PROCESSO CONTÍNUO X LEITO FIXO

Quando o processo contínuo de adsorção de ácido clavulânico foi comparado com o processo em leito fixo, na mesma resina, verificou-se que os dois processos não conseguem concentrar o antibiótico. O processo em leito fixo conseguiu obter fatores de purificação bem maiores que o processo contínuo. O processo contínuo ainda necessita de atenção para se determinar algumas melhorias operacionais e de configuração. Porém, não se pode compará-lo diretamente com o processo em leito fixo, pois este utiliza maior quantidade de resina e a quantidade de solução purificada é menor que no processo contínuo.

8 SUGESTÕES

Em vista de todas as conclusões a que se chegou neste trabalho pode-se citar as seguintes sugestões:

Estudar o processo de purificação de ácido clavulânico na sua totalidade, determinando-se uma seqüência lógica de operações que possibilite a obtenção de um produto com alto grau de pureza.

Identificar os principais contaminantes do meio de fermentação para que seja mais fácil efetuar a separação. Pode-se começar fazendo análise de aminoácidos totais e quantificando cada um.

Utilização de um processo anterior à adsorção, como por exemplo extração com solvente, para concentrar o produto antes da adsorção por troca iônica.

Fazer teste de adsorção com outras resinas como por exemplo a resina de troca aniônica Amberlite FPA40 Cl citada no site da Rohm & Haas como possivelmente utilizada na purificação de ácido clavulânico.

Tentar melhorar o processo contínuo propondo novas configurações dos reatores e aperfeiçoar o transporte de líquido e resina no reciclo do processo contínuo, testando transporte pneumático.

Estudar outro processo de adsorção não-convencional como o processo em leito móvel simulado que proporciona melhores fatores de purificação.

9 BIBLIOGRAFIA

- AL-DURI, B.; MCKAY, G. Pore Diffusion: Dependence of the Effective Diffusivity on the Initial Sorbate Concentration in Single and Multisolute Batch Adsorption Systems. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, v. 55, p. 245-250, 1992.
- ALMEIDA, R.M.R.G.; BARBOZA, M.; HOKKA, C.O. Modelagem e Simulação do Processo Contínuo de Adsorção de Ácido Clavulânico. In: XXIX CONGRESSO BRASILEIRO DE SISTEMAS PARTICULADOS, São João del-Rei, MG, 2001. Anais. (CD ROM). 8p, 2001.
- ALMEIDA, R.M.R.G.; BARBOZA, M.; HOKKA, C.O. Estudo da Cinética de Troca Iônica do Ácido Clavulânico Obtido por Fermentação. In: XIV CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA (COBEQ), Natal, RN, 2002. Anais. (CD ROM). 7p, 2002.
- ALMEIDA, R.M.R.G.; BARBOZA, M.; HOKKA, C.O. Continuous Clavulanic Acid Adsorption Process. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v.105, p.867-879, 2003a.
- ALMEIDA, R.M.R.G.; MENDES, M.T.A.G.; BARBOZA, M.; HOKKA, C.O. Estudo da Purificação de Ácido Clavulânico com Resina de Troca Iônica em Coluna de Leito Fixo. In: XIV SIMPÓSIO NACIONAL DE FERMENTAÇÕES (SINAFERM), Florianópolis, SC, 2003b. Anais. (CD ROM). 7p, 2003b.
- ALVES, A. M. B.; MORÃO, A.; CARDOSO, J. P. Isolation of Antibiotics from Fermentation Broths Using Membrane Technology. *Desalination*, 148, p.181-186, 2002.

- AQUARONE, E.; BORZANI, W.; LIMA, U.A. Biotecnologia: Tecnologia das Fermentações, vol. 1, Ed. Edgard Blucher Ltda e EDUSP, São Paulo, 1975.
- AQUINO, L. C. L.; ROSA, P. T. V.; BUENO, S. M. A. Adsorção de Imunoglobulina G em Histidina Imobilizada em Gel de Metacrilato. Anais do XIV Congresso Brasileiro de Engenharia Química, Natal, RN, Brasil, TRB-332, 2002.
- BAGGALEY, K.H.; BROWN A.G.; SCHOFIELD, C.J. Chemistry and biochemistry of clavulanic acid and other clavams. Natural Product Reports, v. 14, n. 4, p.309-333, 1997
- BAILEY, J.E. & OLLIS, D.F. Biochemical Engineering Fundamentals, 2^a. ed. McGraw - Hill Book Company, New York, 1986.
- BARBOZA, M. Estudo Cinético de Adsorção, Modelagem Dinâmica e Otimização de Processo Contínuo de Purificação de Cefalosporina C. Campinas, DEA-FEA-UNICAMP, 1998. (Tese de Doutorado).
- 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.
- BARBOZA, M.; HOKKA, C. O.; MAUGERI, F. Continuous Cephalosporin C Purification: Dynamic Modelling and Parameter Validation. Bioprocess and Biosystem Engineering, 25, p. 193-203, 2002a.
- BARBOZA, M.; ALMEIDA, R.M.R.G.; HOKKA, C.O. Intrinsic kinetic parameters of clavulanic acid adsorption by ion exchange chromatography. *Industrial of Engineering and Chemical Research*, v.41, p.5789-5793 2002b.
- BARBOZA, M.; ALMEIDA, R.M.R.G.; HOKKA, C.O. Kinetic studies of clavulanic acid recovery by ion exchange chromatography. *Bioseparation*, v.10, p.221-227, 2002c.

- BARBOZA, M.; ALMEIDA, R.M.R.G.; HOKKA, C.O. Influence of temperature on the kinetics of adsorption and desorption of clavulanic acid by ionic exchange. *Biochemical Engineering Journal*, 3656, p.1-8 2003.
- BARRETO JR, A. G.; CARVALHAES, S. F.; BISCAIA JR, E. C. Modelagem e Simulação da Adsorção por Troca Iônica de Fenilalanina em Leito Fixo. Anais do XXIX Congresso Brasileiro de Sistemas Particulados, São João Del Rei, MG, Brasil, TRB-53, 2001.
- BATISTA-NETO, A. Estudos Cinéticos e Reológicos do Processo Descontínuo de Produção de Ácido Clavulânico por *Streptomyces clavuligerus*. São Carlos, DEQ-UFSCAR, 2000. (Dissertação de Mestrado).
- BAUTISTA, L. F.; MARTÍNEZ, M.; ARACIL, J. Adsorption Equilibrium of α -Amylase in Aqueous Solutions. *AIChE Journal*, v. 45, n.4, p.761-768, 1999.
- BERSANETTI, P. A.; BARBOZA, M.; HOKKA, C. O.; ARAUJO, M. L. G. C. Estudos Cinéticos de Hidrólise do Ácido Clavulânico. Anais do XIII SINAFERM (Simpósio Nacional de Fermentações), Teresópolis, RJ, Brasil, 39.1-39.6, 2000.
- BELTER, P. A. Ion Exchange Recovery of Antibiotics. In: Moo-Young M ed. *Comprehensive Biotechnology*, v. 2, p.473-480, Pergamon Press, New York, 1985.
- BIRD, A. E.; BELLIS, J.M.; BASSON B.C. Spectrophotometric assay of clavulanic acid by reaction with imidazole. *Analyst*, v. 107, p. 1241-1245, 1982.
- BJURSTROM, E. Biotechnology Fermentation and Downstream Processing. *Chem. Eng.*, v.92, p.126-158, 1985.
- BOOTHROYD, B. Recovery of Antibiotics using Column Extraction Methods. *Bioactive Microbial Products 3 – Downstream Processing*. J. D. Stowell; P. J. Bailey; D. J. Winstanley Ed. Academic Press, p.59-75, 1986.
- BROWN, A. G.; BUTTERWORTH, D.; COLE, M.; HANSCOMB, G.; HOOD, J. D.; READING, C.; ROLINSON, G. N. Naturally Ocurring β -Lactam Inhibitors with Antibacterial Activity. *The Journal of Antibiotics*, v. 29, n. 6, p. 668-669, 1976.

- BURKERT, C. A. V.; MAUGERI, F. Separação de Monossacarídeos por Adsorção em Zeólita. Anais do XIV Congresso Brasileiro de Engenharia Química, Natal, RN, Brasil, TRB-513, 2002.
- BUTTERWORTH, D. Clavulanic Acid: Properties, Biosynthesis and Fermentation. In: Vandamme, E. J. Biotechnology of Industrial Antibiotics, New York, by Marcel Dekker, Inc., cap. 6, p. 225-235, 1984.
- CARMO, M. J.; ADEODATO, M. G.; VIEIRA, R. S.; MOREIRA, A. M.; PARENTE JR, E. J. S. Estudo Termodinâmico e Cinético de Adsorção em Fase Líquida para Sistemas Metanol-Água, Propanol-Água e Butanol-Água sobre Matéria-Prima Amilácea. Anais do XXIX Congresso Brasileiro de Sistemas Particulados, São João Del Rei, MG, Brasil, TRB-54, 2001.
- CASSIANO – FILHO, L. C. M. Avaliação do Desempenho de Biorreator “Airlift” para a Produção de Ácido Clavulânico por *Streptomyces clavuligerus*. São Carlos, DEQ-UFSCAR, 2003. (Dissertação de Mestrado).
- COLE, M.; HOWARTH, T. T.; READING, C. Process of Production of Clavulanic Acid. US Patent 4110165, 1978.
- COLEMAN, K.; ATHALYE, M.; CLANCEY, A.; DAVISON, M.; PAYNE, D. J.; PERRY, C. R.; CHOPRA, I. Bacterial Resistance Mechanisms as Therapeutic Targets. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, v. 33, p. 1091-1116, 1994.
- COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. Introdução a Métodos Cromatográficos. Editora Unicamp, Campinas, 1995.
- CRUZ, J. M.; SANTANA, C. C. Adsorção de Insulina em Leito Fixo e Fluidizado de Resina Trocadora de Íons. Anais do XXIV ENEMP, Uberlândia MG, Brasil, 568-573, 1996.
- ECKERS, C.; CHALKLEY, R.; HASKINS, N.; EDWARDS, J.; GRIFFIN, J.; ELSON, S. Investigation into the Use of Derivatization with Imidazole for the Detection of Clavam Compounds by Liquid Chromatography-Mass Spectrometry. Analytical Communications, v. 33, p. 215-218, 1996.

- FLEMING, I. D.; NOBLE, D.; NOBLE-GILLET, H. M.; WALL, W. F. Pure Potassium Salt of Clavulanic Acid. US Patent 4367175, 1983.
- FOULSTONE, M.; READING, C. Assay of Amoxicilin and Clavulanic Acid, the Components of Augmentin, in Biological Fluids with High-Performance Liquid Chromatography. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, p. 753-762, 1982.
- 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.
- GILES, C. H.; MacEWAN, T.H.; NAKHWA, S. N.; SMITH, D. M. Studies in Adsorption. Part XI. A system of classification of solution adsorption isotherms, and its use in diagnosis of adsorption mechanisms and in measurement of specific surface areas of solids. J. Chem. Soc., 6M, p. 3973-3993, 1960.
- GONÇALVES, S. B.; ALVES, T. L. M.; SALIM, V. M. M. Estudo dos Fenômenos de Interface no Processo de Separação de Proteínas por Adsorção. Anais do XIV Congresso Brasileiro de Engenharia Química, Natal, RN, Brasil, TRB-352, 2002.
- GORDON, N. D.; TSUJIMURA, H.; COONEY, C. L. Optimization and Simulation of Continuous Affinity-Recycle Extraction (CARE). Bioseparation, v.1, p.09-21, 1990.
- GOUVEIA, E. R.; BAPTISTA-NETO, A.; AZEVEDO, A. G.; BADINO-JR, A. C.; HOKKA; C. O. Improvement of Clavulanic Acid Production by *Streptomyces clavuligerus* in Medium Containing Soybean Derivatives. World Journal of Microbiology & Biotechnology, v. 15, p. 623-627, 1999.
- GOUVEIA, E. R. Desenvolvimento do Processo de Produção de Ácido Clavulânico por *Streptomyces clavuligerus* NRRL 3585. São Carlos, DEQ-UFSCAR, 2001. (Tese de Doutorado).
- GUBULIN, J.C. Transferência de Massa em Sistemas Particulados: Aspectos Gerais do Fenômeno de Adsorção. In: Freire, J. T.; Gubulin J. C. Tópicos Especiais em Sistemas Particulados, São Carlos, v. 3, cap. 5, p. 203-291, 1990.
- HAGINAKA, J.; NAKAGAWA, T.; UNO, T. Stability of clavulanic acid in aqueous solution. Chemical and Pharmaceutical Bulletin, v. 29, n. 11, p. 3334-3341, 1981.

- HECHT, V.; VORLOP, J.; KALBITZ, H.; GERTH, K.; LEHMANN, J. Vortex Chamber for in situ Recovery of the Antibiotic Myxovirescin A in Continuous Cultivation. Biotechnology and Bioengineering, v. XXIX, p. 222-227, 1987.
- HIRATA, D. B. Produção de Ácido Clavulânico em Batelada Alimentada por *Streptomyces clavuligerus* e Extração em Sistemas de Duas Fases Aquosas. São Carlos, DEQ-UFSCAR, 2003. (Dissertação de Mestrado).
- KALIL, S.; MAUGERI, F.; RODRIGUES, M. I. Estudo da Purificação de Inulinase de *Kluyveromyces marxianus* ATCC 16045 Usando Resina de Troca Iônica Streamline SP em Coluna de Leito Fixo. Anais do XIII SINAFERM (Simpósio Nacional de Fermentações), Teresópolis, RJ, Brasil, 119.1-119.6, 2000.
- KONECNY, J.; FELBER, E.; GRUNER, J. Kinetics of hydrolysis of cephalosporin C. The Journal of Antibiotics, v. xxvi, n. 3, p. 135-141, 1973.
- MAYER, A. F.; ANSPACH, F.B.; DECKWER, W. D. Purification of Clavulanic Acid by Ion-Pairing Systems. Bioseparation, v.6, p.25-39, 1996.
- MAYER, A. F.; DECKWER, W. D. Simultaneous Production and Decomposition of Clavulanic Acid during *Streptomyces clavuligerus* Cultivation. Appl. Microbiol. Biotechnol., v.45, p.41-46, 1996.
- MAYER, A. F.; HARTMANN R.; DECKWER, W. D. Diffusivities of Clavulanic Acid in Porous Sorption Systems with Ion-Pairing. Chemical Engineering Science, v.52, n. 24, p.4561-4568, 1997.
- NABAIS, A. M. A.; CARDOSO, J. P. Ultrafiltration of Fermented Broths and Solvent Extraction of Antibiotics. Bioprocess Engineering, v.13, p. 215-221, 1995.
- NEDLER, J. A.; MEAD, R. A simplex method for function minimization. Computer Journal, v. 7, 308, 1965.
- OLIVEIRA, G.; MOREIRA, R. A.; MAUGERI, F. Design de Sistema “CARE” para Separação de Beta-glicosidase a partir de Complexo Enzimático. Anais do XXIV ENEMP, Uberlândia MG, Brasil, 798-803, 1996.

- O'SULLIVAN, J.; SYKES, R. B. Beta-Lactam Antibiotics. Biotechnology, 4: Rehm HJ & Reed G (eds). VCH Weinheim, 1986.
- 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.
- PETZOLD, L. Differential Algebraic System Solver (DASSL) Subroutine. Computing and Mathematics Research Division, Lawrence Livermore National Laboratory, Livermore, California, 1989.
- PUNGOR, E.; AFEYAN, N.B.; GORDON, N. F.; COONEY, C. L. Continuous Affinity-Recycle Extraction: a Novel Protein Separation Technique. BIO/TECHNOLOGY, v. 5, p. 604-609, 1987.
- READING, C.; COLE, M. Clavulanic Acid: a Beta-Lactamase Inhibiting Beta-Lactam from *Streptomyces clavuligerus*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v. 11, n. 5, p. 852-857, 1977.
- RODRIGUES, M.I.; ZAROR, C.A.; MAUGERI, F.; ASENJO, J.A. Dynamic Modelling, Simulation and Control of Continuous Adsorption Recycle Extraction. Chemical Engineering Science v.47, n. 1, p. 263-269, 1992.
- ROSA, J. C.; BADINO-JR, A. C.; BAPTISTA-NETO, A.; HOKKA, C.O. Cisão e transferência de oxigênio na produção de ácido clavulânico por *Streptomyces clavuligerus*. Anais do SB-Biotec, São Paulo, SP, 2001.
- ROSA, J. C. Influência das Condições de Transferência de Oxigênio na Produção de Ácido Clavulânico por *Streptomyces clavuligerus*. São Carlos, DEQ-UFSCAR, 2002. (Dissertação de Mestrado).
- SLEIJKO, F. L. Adsorption Technology: A Step-by-Step Approach to Process Evaluation and Application. Marcel Dekker, Inc., New York, 1985.
- VIDEIRA, M.; AIRES-BARROS, M. R. Liquid-Liquid Extraction of Clavulanic Acid Using an Aqueous Two-Phase System of Polyethylene Glycol and Potassium Phosphate. Journal of Chromatography A v. 668, p. 237-240, 1994.

VILLADSEN, J.; MICHELSEN, M. L. Solution of Differential Equation Models by Polynomial Approximation. Prentice Hall, Englewood Cliffs, N. J., 1978.

WARD, O. P. Biochemical Separations. In: Bioprocessing. Van Nostrand Reinhold, New York, cap.4, p.55-72, 1991.

10 LISTA DE PUBLICAÇÕES

10.1 PUBLICAÇÕES EM EVENTOS CIENTÍFICOS

ALMEIDA, R.M.R.G.; BARBOZA, M.; HOKKA, C.O. (2001). Modelagem e Simulação do Processo Contínuo de Adsorção de Ácido Clavulânico. In: XXIX CONGRESSO BRASILEIRO DE SISTEMAS PARTICULADOS, São João del-Rei, MG, 2001. Anais. (CD ROM). 8p.

ALMEIDA, R.M.R.G.; BARBOZA, M.; HOKKA, C.O. (2002). Estudo da Cinética de Troca Iônica do Ácido Clavulânico Obtido por Fermentação. In: XIV CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA (COBEQ), Natal, RN, 2002. Anais. (CD ROM). 7p.

ALMEIDA, R.M.R.G.; MENDES, M.T.A.G.; BARBOZA, M.; HOKKA, C.O. (2003). Estudo da Purificação de Ácido Clavulânico com Resina de Troca Iônica em Coluna de Leito Fixo. In: XIV SIMPÓSIO NACIONAL DE FERMENTAÇÕES (SINAFERM), Florianópolis, SC, 2003. Anais. (CD ROM). 7p.

10.2 ARTIGOS DE PERIÓDICOS

ALMEIDA, R.M.R.G.; BARBOZA, M.; HOKKA, C.O. (2003). Continuous Clavulanic Acid Adsorption Process. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v.105, p.867-879.

BARBOZA, M.; ALMEIDA, R.M.R.G.; HOKKA, C.O. (2003). Influence of temperature on the kinetics of adsorption and desorption of clavulanic acid by ionic exchange. *Biochemical Engineering Journal*, 3656, p.1-8.

BARBOZA, M.; ALMEIDA, R.M.R.G.; HOKKA, C.O. (2002). Intrinsic kinetic parameters of clavulanic acid adsorption by ion exchange chromatography. *Industrial of Engineering and Chemical Research*, v.41, p.5789-5793.

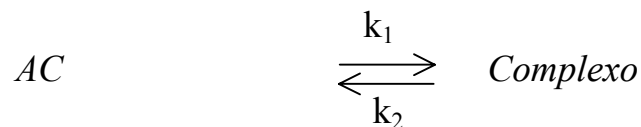
BARBOZA, M.; ALMEIDA, R.M.R.G.; HOKKA, C.O. (2002). Kinetic studies of clavulanic acid recovery by ion exchange chromatography. *Bioseparation*, v.10, p.221-227.

10.3 ARTIGOS EM MEIO ELETRÔNICO

ALMEIDA, R.M.R.G.; BERSANETTI, P.A.; BARBOZA, M.; ARAUJO, M.L.G.C.; HOKKA, C.O. (2002) Kinetic studies on clavulanic acid degradation. Disponível no site www.chemweb.com Código do artigo: chemeng 0205001.

APÊNDICE A

Esse apêndice mostra que a constante cinética intrínseca também pode ser determinada considerando-se que, no momento em que o líquido (adsorbato) entra em contato com a fase sólida (adsorvente), a adsorção ocorre instantaneamente na superfície externa do sólido e que a quantidade que se difunde no interior do sólido não é limitada pela etapa de difusão. Para descrever, de forma simplificada o processo de troca iônica do AC na resina apresenta-se um esquema para reação reversível de primeira ordem (Barboza et al., 2002b).



Assim

$$\frac{dC_{AC}}{dt} = -k_1 C_{AC} + k_2 C_B \quad (A.1)$$

onde B é o AC na forma de complexo.

A concentração de B pode ser expressa em termos de C_{AC} .

$$C_B = C_{AC_0} - C_{AC} \quad (A.2)$$

onde C_{AC_0} é a concentração inicial de AC.

A Equação A.2 combinada com a Equação A.1, resulta na Equação A.3:

$$\frac{dC_{AC}}{dt} = -k_1 C_{AC} + K_D k_1 (C_{AC_0} - C_{AC}) \quad (A.3)$$

onde K_D é a constante de equilíbrio. Considerando-se o processo em equilíbrio a Equação A.3 torna-se:

$$K_D = \frac{C_{AC}^*}{(C_{AC0} - C_{AC}^*)} \quad (A.4)$$

onde C_{AC}^* é a concentração de equilíbrio de AC. Dessa forma, C_{AC0} pode ser expressa como:

$$C_{AC0} = C_{AC}^* \left(\frac{1 + K_D}{K_D} \right) \quad (A.5)$$

Pela substituição da Equação A.5 na Equação A.3 tem-se:

$$\frac{d\bar{C}_{AC}}{dt} = -k_R \bar{C}_{AC} \quad (A.6)$$

onde:

$$k_R = k_1 (K_D + 1) \quad (A.7)$$

$$\bar{C}_{AC} = (C_{AC} - C_{AC}^*) \quad (A.8)$$

A Equação A.6 pode ser resolvida, tendo-se:

$$-\ln \frac{C_{AC} - C_{AC}^*}{C_{AC0} - C_{AC}^*} = k_R t \quad (A.9)$$

Os ensaios em batelada e de equilíbrio podem ser usados para obtenção de k_R ; conseqüentemente, k_1 pode ser determinado pela Equação A.7.

APÊNDICE B

Tabela B1: Efeitos significativos das variáveis e suas interações no rendimento.

Variáveis	Efeito
MÉDIA	59,5394
(1)C0	1,9328
(2)TETAR1	-5,7041
(3)TETAR2	17,9322
(4)TETAS1	-26,1741
(6)ER2	-12,3966
1 by 2	-2,4866
1 by 4	2,1759
2 by 3	-3,3178
2 by 4	-5,2578
2 by 6	1,0203
3 by 4	6,5147
3 by 5	5,5859
3 by 6	-10,3922
4 by 5	-1,7966
4 by 6	2,8803
5 by 6	4,8816
1*2*4	1,1659
2*3*4	1,4259
2*3*5	1,0184
2*3*6	-1,8472
2*5*6	0,7528
3*4*5	-1,7741
3*4*6	3,2566
3*5*6	2,1703
4*5*6	-1,8897

Tabela B2: Efeitos significativos das variáveis e suas interações no fator de concentração.

Variáveis	Efeito
MÉDIA	0,367862
(1)C0	0,152000
(2)TETAR1	-0,03431
(3)TETAR2	-0,06444
(4)TETAS1	0,138563
(5)ER1	0,009500
(6)ER2	-0,07956
1 by 2	-0,00675
1 by 3	-0,01087
1 by 4	0,009063
1 by 5	0,005000
1 by 6	-0,00894
2 by 3	-0,00725
2 by 4	0,013938
2 by 5	0,004125
2 by 6	-0,00806
3 by 4	-0,00519
3 by 5	-0,01375
3 by 6	0,026687
4 by 5	0,003563
4 by 6	-0,00662
5 by 6	-0,01644
1*2*3	-0,00169
1*2*4	0,001750
1*2*5	0,001187
1*2*6	-0,00200
1*3*4	0,003000
1*3*5	0,001437
1*3*6	-0,00262
1*4*5	-0,00150

Continua Tabela B.2	
1*4*6	0,003062
1*5*6	0,001250
2*3*4	0,001375
2*4*5	-0,00112
2*4*6	0,002187
3*4*5	0,001375
3*4*6	-0,00294
3*5*6	-0,00250
4*5*6	0,002313

Tabela B3: Efeitos significativos das variáveis e suas interações no fator de purificação.

Variáveis	Efeito
MÉDIA	1,698615
(1)C0	-0,246250
(2)TETAR1	-0,155625
(3)TETAR2	0,101250
(4)TETAS1	-0,288750
(5)ER1	-0,005625
(6)ER2	0,128125
1 by 2	-0,050000
1 by 3	-0,007500
1 by 4	0,044375
2 by 3	-0,013125
2 by 4	-0,035000
2 by 5	0,003750
2 by 6	-0,009375
3 by 4	0,036250
3 by 5	0,021250
3 by 6	-0,044375
4 by 5	-0,015625
4 by 6	0,032500
5 by 6	0,023750

Continua Tabela B.2	
1*2*4	0,017500
1*3*6	0,003125
2*3*4	0,009375
2*3*6	-0,005000
2*4*6	0,004375
2*5*6	0,003125
3*4*5	-0,003750
3*4*6	0,008125
4*5*6	-0,005000