

Purificação da Cefalosporina C por cromatografia de troca iônica em coluna de leito fixo

Purification of Cephalosporin C by ion exchange chromatography on a fixed bed column

William Cardoso Gonçalves da Rocha¹; Geoffroy Roger Pointer Malpass²; Marlei Barboza Pasotto³; Ana Claudia Granato Malpass⁴

¹Aluno do Programa de Mestrado Profissional em Inovação Tecnológica, Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, Minas Gerais, Brasil. E-mail: t_willian@hotmail.com

² Professor do Programa de Mestrado Profissional em Inovação Tecnológica, Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, Minas Gerais, Brasil. Orcid: 0000-0002-0036-5750. Email: geoffroy.malpass@uftm.edu.br

³ Professor do Programa de Mestrado Profissional em Inovação Tecnológica, Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, Minas Gerais, Brasil. E-mail: marlei.uftm@gmail.com

⁴ Professor do Programa de Mestrado Profissional em Inovação Tecnológica, Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, Minas Gerais, Brasil. ORCID: 0000-0001-6487-1225. E-mail: ana.malpass@uftm.edu.br

RESUMO: O presente trabalho teve como objetivo verificar a viabilidade do uso da técnica de cromatografia de troca iônica no processo de purificação da Cefalosporina C (CPC) empregando-se a resina amberlite IRA410 de troca aniônica como recheio da coluna. A CPC interagiu bem com a resina IRA 410, mostrando que a resina é capaz de adsorver a CPC em diferentes condições de concentração. A eluição do antibiótico realizada com a solução de cloreto de sódio a 4% m/v se mostrou eficiente, o pico obtido não é largo e elui em um tempo pequeno a partir da aplicação da solução de eluição, sendo assim, viável economicamente. Os parâmetros da coluna, obtidos a partir das curvas de ruptura sem controle da vazão e temperatura, mostraram altos valores de eficiências com relação à remoção do soluto da solução. Obtendo-se as curvas de ruptura diminuindo o tamanho do leito e controlando a temperatura e vazão, houve um aumento da eficiência de uso do leito. O modo de eluição isocrático mostrou-se mais eficiente já que faz com a CPC foi recuperada em menor tempo e em menos frações, gerando economia de tempo e também de consumíveis para o processo.

Palavras-chave: Cefalosporinas; Cromatografia; Troca iônica; amberlite IRA410.

ABSTRACT: The aim of the present work was to verify the feasibility of the use of the ion exchange chromatography technique in the purification process of Cephalosporin C (CPC) using the amberlite resin IRA410 of anion exchange as column filling. CPC interacted well with IRA 410 resin, showing that the resin is able to adsorb CPC under different concentration conditions. Elution of the antibiotic from the 4% w / v sodium chloride solution proved to be efficient, the obtained peak is not wide and elutes in a short time from the application of the elution solution and is thus economically viable. The column parameters, obtained from the rupture curves without flow and temperature control, showed high efficiency values in relation to solute removal from the solution. By obtaining the rupture curves decreasing the size of the bed and controlling the temperature and flow, there was an increase of the efficiency of use of the bed. The isocratic elution mode proved to be more efficient since it makes the CPC recovered in less time and in fewer fractions, thus saving time and also consumables for the process.

Keywords: Cephalosporins, Chromatography, Ion exchange, amberlite IRA410.

INTRODUÇÃO

A descoberta dos antibióticos β -lactâmicos se deu por acaso em 1929, quando A. Fleming notou que o crescimento de colônias bacterianas havia sido inibido por alguma contaminação presente no meio de cultura. Sua investigação levou-o a descobrir que sua cultura havia sofrido uma contaminação pelo fungo *Penicillium chrysogenum*. A substância responsável pela inibição do crescimento das colônias bacterianas produzida pelo fungo foi descoberta, caracterizada e recebeu o nome de penicilina (MUNIZ *et al.*, 2007). O sucesso da penicilina para fins terapêuticos alavancou a indústria de produtos biotecnológicos. Esse sucesso também fez com que surgissem novas linhas de pesquisa, tanto no desenvolvimento de novas moléculas quanto também no melhoramento de processos produtivos e de purificação de compostos antimicrobianos.

Em 1945 uma nova classe de β -lactâmicos foi descoberta por G. Brotzu ao pesquisar sobre a febre tifoide na Itália. Após alguns anos, essa nova classe foi caracterizada e nomeada como cefalosporinas (MUNIZ *et al.*, 2007). O mecanismo de atuação das cefalosporinas é semelhante ao das penicilinas inibindo a síntese da parede celular das bactérias, porém é mais resistente às β -lactamases bacterianas. Seu amplo espectro de ação possibilita o combate a patógenos Gram-positivos e Gram-negativos (PAGE; LAWS, 2000).

Além das penicilinas e cefalosporinas, existem também os carbafens, as clavamas e as monobactamas. Todas essas classes de compostos β -lactâmicos tem em comum a presença do anel β -lactâmico que é diretamente responsável pela atividade antimicrobiana. As diferenças entre as classes se baseiam no segundo anel ligado ao anel β -lactâmico, e na posição onde são inseridos alguns ligantes (DEMAIN; ELANDER, 1999).

Os compostos β -lactâmicos respondem por uma importante fatia do mercado de antimicrobianos. No ano de 2009 as vendas das cefalosporinas atingiram um total de US\$ 11,9 bilhões, representando 28% do total de antibióticos vendidos no mundo todo, o maior percentual dentre todas as classes de β -lactâmicos (HAMAD, 2010). Os grandes valores econômicos aliados aos bons resultados terapêuticos demonstram a importância desses compostos, e dessa forma, o interesse no desenvolvimento de novas moléculas e também o melhoramento dos processos produtivos e de purificação se tornaram áreas de extensa investigação.

A produção da Cefalosporina C (CPC) é realizada via fermentação submersa pelos fungos *Cephalosporium acremonium* e *Acremonium chrysogenum*. Devido à complexidade do caldo fermentativo, de onde se extrai o antibiótico, são necessárias diversas etapas de purificação, sendo que as mesmas são responsáveis por cerca de 50% do custo total de produção do antibiótico. Dentre as operações envolvidas no processo de recuperação da CPC, podem ser citadas: Moagem para o rompimento das células, centrifugação, filtração em diversas escalas, purificação de baixa resolução por extração e ultrafiltração, e purificação de alta resolução normalmente realizada por cromatografia (ELANDER, 2003).

As etapas de purificação da CPC devem proporcionar alta pureza do produto recuperado, devido à finalidade de uso que é produzir fármacos. Dessa forma, a técnica mais comumente usada para atingir esse objetivo é a cromatografia de adsorção em colunas de leito fixo. Na literatura encontram-se diversos estudos acerca da purificação da CPC usando cromatografia por adsorção com resinas neutras. Através desta técnica é possível obter a molécula com alto grau de pureza, porém, a capacidade de adsorção dessas resinas é baixa (BARBOZA; ALMEIDA; HOKKA, 2003). Esse fato motiva a investigação de alternativas para se purificar o caldo fermentativo de produção da CPC.

Desta forma, esse trabalho teve como objetivo verificar a viabilidade do uso da técnica de cromatografia de troca iônica no processo de purificação da CPC empregando-se a resina amberlite IRA410 de troca aniônica como recheio da coluna.

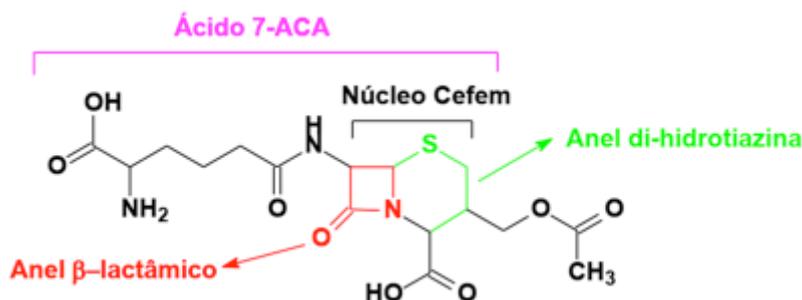
REVISÃO DA LITERATURA

A CPC pertence à classe das Cefalosporinas e leva essa nomenclatura pelo fato de ter sido a primeira molécula deste grupo a ser descoberta. Esse composto foi descoberto em 1945, quando o Professor G. Brotzu investigava casos de febre tifoide na ilha da Sardenha, durante suas observações ele notou que um grupo de pessoas que se banhava em águas residuais não contraía a doença. Seus estudos mostraram que a água continha o fungo *Cephalosporium acremonium*, e que o mesmo era capaz de produzir uma substância que inibia o crescimento da *Salmonella typhii*, bactéria que causa a febre tifoide. Brotzu então enviou amostras desse fungo para Newton e Abraham em Oxford. Em 1955, esses pesquisadores descobriram que essa cepa produzia uma substância capaz de inibir o crescimento de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, além de ser estável em pH ácido e também resistente às β -

lactamases bacterianas. Essa substância foi isolada, caracterizada e nomeada como Cefalosporina C (CPC) (MUNIZ *et al.*, 2007; DEMAIN; ELANDER, 1999).

As cefalosporinas apresentam como característica marcante a presença de uma parte da molécula formada pelo anel β -lactâmico ligado a outro anel de 6 membros denominado de di-hidrotiazina. Esse núcleo bicíclico é denominado núcleo Cefem e esse núcleo é comum a todas as classes de cefalosporinas. No caso da CPC o esqueleto principal da molécula é constituído pelo ácido 7-aminocefalosporânico (7-ACA), composto pelo núcleo cefem mais a cadeia lateral D- α -ácido aminoalípico, todos esses grupos podem ser observados na Figura 1.

Figura 1 - A molécula da cefalosporina C, em detalhe as principais regiões da molécula.



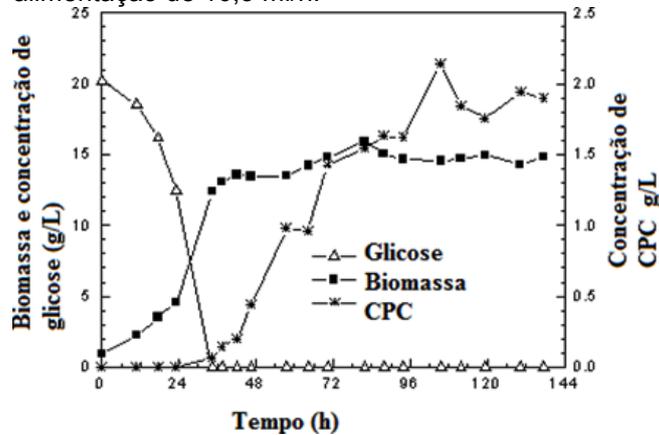
A CPC não é um antibiótico potente quando usado diretamente, e por isso, não é comercializada para fins terapêuticos, seu uso principal é como precursor de cefalosporinas semissintéticas, que são antibióticos mais potentes e de amplo espectro, capazes de combater patógenos gram-positivos e negativos, além de apresentarem maior resistência às β -lactamases bacterianas. As cefalosporinas semissintéticas são produzidas a partir de modificações estruturais na molécula da CPC e são classificadas em gerações, de acordo com seu espectro de ação e sua resistência às β -lactamases (ELANDER, 2003).

Os antibióticos β -lactâmicos atuam na inibição das enzimas transpeptidases bacterianas, responsáveis pela catálise da reação de formação das ligações cruzadas da parede celular. O efeito da inibição dessa reação gera uma parede celular fraca e de fácil rompimento. A ação antibacteriana desses compostos está intimamente ligada ao anel β -lactâmico. A reação se baseia na acilação de sítios nucleofílicos da enzima, modificando seu sítio ativo e fazendo com que a mesma perca sua atividade (PAGE; LAWS, 2000). A inibição da atividade dos compostos β -lactâmicos é realizada pela enzima bacteriana β -lactamase, essa enzima cliva o anel β -lactâmico e gera como produto um composto sem atividade antibacteriana (FISHER; MEROUEH; MOBASHERY, 2005).

Segundo Demain, a molécula da CPC é resultado do metabolismo secundário do microrganismo (DEMAIN, 1971). Inicialmente, durante a fase de crescimento ou *fase log*, o fungo realiza o metabolismo primário, sintetizando as proteínas, carboidratos e outras moléculas que darão origem às organelas necessárias para sobrevivência e reprodução. A CPC começa a ser observada no meio quando termina a fase de crescimento do fungo e o mesmo entra na idiofase ou *fase lag*. Nessa fase observa-se pouco aumento de biomassa do microrganismo e aumento da concentração de antibiótico no meio, fruto de reações do metabolismo secundário (CALAM, 1987). Este comportamento descrito pode ser observado na figura 2, que mostra os perfis de quantidade de biomassa, de concentração de glicose para alimentação e de concentração de CPC durante um processo de fermentação. O metabolismo secundário é composto de reações paralelas às que estão dedicadas a suprir as necessidades essenciais do organismo e, aparentemente, não tem importância direta para o crescimento e reprodução dos mesmos, porém, seus metabólitos se mostram importantes para os mecanismos de defesa da célula (CUNHA, 1975). E mesmo desempenhando funções bem distintas, as rotas primária e secundária do metabolismo exibem um complexo mecanismo de regulação, competindo por moléculas que são intermediárias chaves para ambas.

Com os processos metabólicos de produção da CPC elucidados, os pesquisadores passaram então a investigar as possíveis regulações metabólicas que poderiam resultar em aumento da produção da CPC. Vários estudos reportam importantes descobertas acerca do tema. Demain, Newkirk e Hendlin (1963) demonstraram que através do atraso do metabolismo secundário poderia obter-se um maior rendimento na produção de CPC. Isso acontece porque no início da fase de crescimento, o microrganismo é sensível ao seu próprio antibiótico. Porém, após o crescimento, o mesmo torna-se resistente (BEHMER; DEMAIN, 1983).

Figura 2 - Perfil de concentração de glicose, crescimento celular e de produção de CPC durante uma fermentação em batelada alimentada com taxa de alimentação de 10,3 ml/h.



Fonte: Adaptado de Silva, 1998.

A produção industrial da CPC é realizada atualmente pelo processo de fermentação em batelada alimentada, no qual a matriz energética pode ser tanto carboidratos simples, complexos ou até mesmo óleos ricos, como o óleo de soja. Como fonte de nitrogênio no processo são usados semente de algodão e soja, e também amônia e sulfato de amônia, que contribuem com a regulação do pH. A água de maceração do milho também é adicionada, contribuindo como fonte de aminoácidos, vitaminas e elementos traço. A disponibilidade de oxigênio dissolvido é um fator de extrema importância durante o processo fermentativo, pois, as expressões máximas das enzimas *ciclase* e *expandase* estão intimamente ligadas a esse fator e essa disponibilidade resulta em rápida produção de CPC. A metionina também é adicionada no processo e sua função, além de fonte de enxofre, é ajudar no aumento da eficiência da transformação do micélio em atrosporo e é na forma de atrosporo que o microrganismo produz a CPC. O pH e a temperatura do processo também são controlados e mantidos nas faixas de 6,2 a 7,0 e 24 a 28°C, respectivamente (ELANDER, 2003).

A engenharia genética tem se destacado na busca por aumentar a produtividade da CPC através de cepas dos fungos produtores. O objetivo é descobrir os genes que estão ligados à produção da CPC e buscar formas de aumentar a expressão dos mesmos. Com o desenvolvimento da biologia molecular encontram-se na literatura trabalhos que reportam a identificação dos genes e também de uma variedade de cepas geneticamente modificadas (SKATRUD *et al.*, (1989); ELANDER, 2003; BASCH; CHIANG, 1998)

Geralmente os caldos fermentados de bioprocessos são extremamente complexos, podendo conter uma variedade de componentes, como substratos não convertidos em produtos, células mortas, nutrientes diversos do meio de cultivo e o produto de interesse que pode se encontrar no meio extra ou intracelular. Devido a essa complexidade, várias operações unitárias são necessárias para promover a separação e purificação do produto de interesse de maneira eficiente. Dentre as operações mais utilizadas para recuperação de produtos oriundos de bioprocessos pode-se citar: filtração, centrifugação, separação por membranas, resfriamento, aquecimento, secagem, extração por solvente, cromatografia de adsorção, de troca iônica, precipitação, cristalização, entre outras. Os passos necessários para realizar esse processo estão intimamente ligados à natureza e às propriedades do composto de interesse a ser recuperado e também de propriedades do caldo fermentado, a pureza necessária do produto por sua vez está ligada à sua finalidade de aplicação (NAJAFPOUR, 2007).

O processo de purificação industrial da CPC descrito por Elander (2003) é realizado através dos seguintes passos: O caldo fermentado é resfriado rapidamente até uma temperatura entre 3 a 5°C, depois disso é submetido ou a filtração ou centrifugação para promover a remoção dos sólidos presentes, principalmente os micélios do fungo produtor. O processo segue para etapa de purificação, nesta etapa o caldo contém além da CPC, os compostos DAC, DAOC, Isopenicilina N além dos precursores biossintéticos. Para realização desta etapa, são usadas duas estratégias diferentes, algumas companhias usam a adsorção em carbono ativado ou outro adsorvente, seguido de cromatografia de troca-iônica, o que resulta em CPC de alta pureza, que é convertida posteriormente em Ácido 7- aminocefalosporânico (7-ACA). A segunda estratégia consiste em gerar derivados substituídos, onde o grupo amino da cadeia lateral

α -aminoadipil é substituída no C-7, gerando dois derivados: o N-2,4-Diclorobenzoil cefalosporina C e o tetrabromocarboxybenzoil cefalosporina C. Esses derivados podem ser cristalizados a partir de soluções ácidas. Esses derivados substituídos também podem formar sais a partir da reação com bases como dicitclohexilamina ou a dimetilbenzilamina. Esses sais podem ser extraídos por solventes, porém o processo de extração deve ser repetido várias vezes até a obtenção do produto com elevada pureza.

A realização do processo de *downstream* pode representar 50% do custo total do processo produtivo de uma determinada molécula de interesse, por isso, as operações envolvidas devem ser planejadas de forma a otimizar a aplicação, para que se possível usar a mesma operação para a realização de mais de uma etapa do processo. O número de operações também depende da finalidade do produto. Produtos de aplicação farmacêutica, por exemplo, requerem alto grau de pureza devido a sua aplicação, e isso é um fator que torna o processo de *downstream* mais oneroso ainda. Por outro lado, a obtenção desses produtos com elevado grau de pureza torna alto o valor agregado do mesmo. Esse fato faz com que o mercado pague um grande valor pelo produto, tornando compensáveis os custos gerados pelo processo de *downstream* (KEIM; LADISCH, 2000).

Dentre as estratégias de purificação para produtos de biotecnologia, o processo de adsorção se destaca por propiciar a pureza necessária, com bons fatores de concentração, além de ser um processo não destrutivo e energeticamente eficiente. O processo de adsorção consiste em uma operação unitária onde uma corrente de um fluido, seja gás ou líquido, interage com uma fase estacionária sólida, e esta fase sólida é capaz de interagir de diferentes formas com os componentes desta corrente fluida. Normalmente, a fase estacionária é composta por pequenas partículas do sólido alocadas em um leito fixo, que pode ser uma coluna ou um reator. O fluido é então passado através deste leito onde ocorre o processo de adsorção, quando o leito é totalmente saturado com as moléculas do fluido, o fluxo do mesmo é interrompido e então o leito pode ser regenerado através de temperatura ou através de outro método de dessorção. Nesta operação o material adsorvido é chamado de adsorbato e é este que é recuperado após o processo de dessorção (GEANKOPLIS, 2003). A troca iônica é considerada como um processo de adsorção por alguns autores e é possível encontrar termos como adsorção de íons na literatura (BARBOZA; ALMEIDA; HOKKA, 2003).

O processo de adsorção se baseia na interação entre as moléculas do fluido e o adsorvente. Existem diversas maneiras de ocorrerem essas interações, sendo que as mesmas estão diretamente ligadas ao mecanismo de separação envolvido no processo, esses podem ser do tipo: Físico, químico ou mecânico (COLLINS, 2006). Os processos físicos conhecidos como de sorção – adsorção e absorção - se baseiam em atrações dipolares como, forças de Van der Waals, atrações Coulômbicas e também por formação de ligações de Hidrogênio. Quando a fase estacionária é um sólido a adsorção ocorre na interface entre o sólido e o fluido onde se encontram os sítios ativos do sólido. Quando a fase estacionária trata-se de um líquido espalhado sobre a superfície do sólido inerte, o processo de separação é realizado por absorção ou partição e é baseado na solubilidade dos compostos nesta fase estacionária (COLLINS, 2006).

Outro processo é o químico, os grandes representantes desta modalidade são os processos por troca-iônica e os processos baseados em afinidade biológica. No processo por troca-iônica, uma matriz ou um suporte contém em sua superfície grupos que podem ser ionizáveis, dessa forma são obtidos trocadores de íons. Para o processo ocorrer, uma fase móvel tipo solução iônica é passada através do leito contendo o trocador. O composto de interesse deve estar ionizado nessa solução, dessa forma, o mesmo será capaz de competir pelos sítios carregados do trocador e então ser retido. Caso a matriz seja carregada negativamente ela é classificada como trocadora de cátions, pois libera os grupos carregados positivamente para a fase móvel e retém os cátions presentes na mesma. Caso contrário a fase estacionária sendo carregada positivamente, ela será capaz de reter os ânions da fase móvel e liberar os ânions previamente ligados a ela para essa fase, e é classificada como trocadora de ânions. A fase móvel empregada neste processo deve exibir propriedades compatíveis com o trocador escolhido e normalmente é tamponada (COLLINS, 2006). A eluição dos íons retidos é realizada através da passagem de íons competidores que possuam maior afinidade com a matriz e tem capacidade de deslocar novamente o íon retido para a fase móvel. Outro processo químico usado é conhecido por bioafinidade. Nesta modalidade a fase estacionária contém grupos biológicos ligados ao suporte que são complementares aos presentes na fase móvel, por exemplo, fase estacionária contendo antígenos ligados e fase móvel contendo anticorpos. Neste modo, a eluição é realizada através de alterações na fase móvel, como aumento da acidez que modifica propriedades da molécula ligada ao suporte ou até mesmo da molécula retida (COLLINS *et al*, 2006).

O processo mecânico é encontrado na modalidade de cromatografia por exclusão. O mecanismo de separação neste método consiste na diferença de tamanho das moléculas a serem separadas. Uma matriz inerte com partículas de tamanho, forma e porosidade uniformes serve como fase estacionária, desse modo, moléculas menores penetram os poros ficam em equilíbrio com a fase móvel intra e intersticial, as

moléculas maiores são excluídas totalmente dos poros equilibrando-se com a fase móvel intersticial apenas e moléculas de tamanho médio penetram seletivamente nos poros de acordo com sua compatibilidade de tamanho. A saída da coluna é dada então em função do tamanho da molécula.

O equilíbrio entre a concentração de soluto no fluido e a concentração de soluto no sólido tem comportamento parecido com as relações de equilíbrio de concentração de gases solubilizados em líquidos. Essas relações são representadas através de parâmetros relacionados com a quantidade de adsorbato em relação quantidade de adsorvente (GEANKOPLIS, 2003). Essas relações são obtidas à temperatura constante e são denominadas isotermas de adsorção. Existem alguns modelos desenvolvidos de isotermas usados para explicar o comportamento dos processos de adsorção.

Estudos sobre a cinética de reação também podem fornecer diversas informações sobre os fenômenos envolvidos no processo de adsorção. O processo de adsorção pode ser tratado como uma reação química, onde o adsorbato “reage” com o adsorvente formando um complexo. Essa pseudo-reação pode ser vista como reação de primeira ordem, de pseudo-primeira ordem e de segunda ordem. Desta forma, é possível a modelagem do processo através de constantes de velocidade e dados obtidos das isotermas. Esses dados podem indicar se o processo é favorável e, além disso, é possível obter estimativas de alguns parâmetros termodinâmicos do processo. Baseado na proposta de mecanismo descrita anteriormente, a resina IRA410 também pode se comportar como um reagente da “reação” de adsorção, onde nos sítios da resina o íon cloreto é trocado pela CPC carregada negativamente, originando o “produto” da reação que é o complexo CPC+Resina.

Existem dois principais modos de operação de sistemas de adsorção destinados à purificação de produtos. São os sistemas por reator alimentado e por colunas de leito fixo. O processo de adsorção realizado em colunas de leito fixo é mais complexo do que o realizado através de reatores. O fluido a ser tratado percorre a coluna com um fluxo constante, o processo depende da resistência à transferência de massa e também de outros fatores dinâmicos do sistema. O perfil de concentração do soluto na solução de alimentação varia conforme o tempo e a posição dentro da coluna, decaindo rapidamente conforme a solução avança pela coluna, sendo que esse passo se repete várias vezes até o fim da coluna. Esse perfil de concentração do adsorbato no interior da coluna é mostrado na figura 7a, e é obtido através do gráfico de C/C_0 contra H , onde C é a concentração do adsorbato em determinado ponto da coluna, C_0 a concentração inicial do adsorbato no fluido e H o comprimento da coluna. Conforme ocorre a passagem do tempo, as partículas do adsorvente próximas à entrada da coluna são saturadas pelo adsorbato e a adsorção começa então a ocorrer em um ponto imediatamente posterior ao ponto saturado. A diferença de concentração durante o caminho é a força motriz do processo. Enquanto o processo de transferência de massa ocorre no interior da coluna, na saída dela a concentração do soluto é aproximadamente igual à zero, e continua com este valor até que a zona de transferência de massa atinja o fim da coluna em um determinado tempo. Quando chega este momento, a concentração do soluto na saída da coluna aumenta até atingir um ponto conhecido como ponto de ruptura. Depois do mesmo a concentração aumenta rapidamente até atingir um ponto onde o leito da coluna não é mais efetivo para promover a adsorção. O ponto de ruptura é definido como sendo o ponto onde C/C_0 é igual aos valores de 0,01 a 0,05. O ponto em que o leito não é mais efetivo é igual a C_d sendo que este é aproximadamente igual a C_0 . Esse comportamento é visualizado através das curvas de ruptura geradas por gráficos de C/C_0 em função do tempo decorrido. Na figura 7b é possível observar uma curva de ruptura representativa.

Figura 7 - Perfis de concentração do adsorbato.



Fonte: Adaptado de Geankoplis, 2003.

Nota: a) Em várias posições no interior da coluna; b) Curva de ruptura ao fim da coluna.

As curvas de ruptura são ferramentas extremamente importantes, pois a partir delas é possível calcular uma série de parâmetros que ajudam a realizar o aumento de escala da coluna, bem como obter a eficiência do leito em diversas condições, promovendo redução de custos. Os cálculos a cerca das curvas de ruptura serão apresentados posteriormente na seção de materiais e métodos.

PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS

Para o empacotamento da coluna adicionou-se uma quantidade da resina Amberlite IRA 410 em um béquer, no qual também se adicionou uma quantidade de água deionizada. Em seguida, transferiu-se essa solução para uma bureta de 25 mL com o auxílio de um funil. Durante a transferência usou-se um bastão de vidro para compactação da resina dentro da coluna, de forma que a resina se assentasse homogeneamente, evitando a formação de vazios ou bolhas no interior da coluna. Após esse processo obteve-se uma coluna com leito de 16,5 cm comprimento. Para realizar o condicionamento da resina passou-se pela coluna cerca de 200 mL de água deionizada a fim de realizar a limpeza da mesma, seguido de 200 mL de solução 4,0% m/V de NaCl para garantir a renovação dos sítios ativos da resina no ciclo do Cloreto e novamente mais 400 mL de água deionizada para remover o excesso de solução salina no leito. Para a preparação das soluções de CPC utilizadas como alimentação, usou-se solução tampão ácido succínico/KOH, (pH 3,6 e força iônica 0,01 M) como diluente. A preparação deste tampão seguiu a metodologia proposta por Perrin (1963), para preparações de tampões para uso em determinações espectrofotométricas. Os valores de pH e força iônica deste tampão foram definidos baseando-se na metodologia experimental proposta por Hicktier e Bucholz (1990) em seu estudo usando a resina de troca aniônica IRA 68 para adsorção de CPC. A CPC usada nos ensaios foi o sal de zinco da cefalosporina C, grau prático, obtida junto a Sigma Aldrich. Usando-se a solução tampão previamente preparada como diluente, foram preparadas as soluções de CPC dissolvendo-se a massa de CPC pesada referente à concentração desejada em balão volumétrico. As soluções resultantes foram estocadas em geladeira à temperatura de 5°C. As concentrações foram definidas nestes valores devido à escala de leitura do equipamento de espectrofotometria Ultravioleta/Visível. À coluna condicionada, injetou-se a solução de CPC na coluna, o monitoramento foi realizado coletando-se frações de 4 ml em frascos *ependorfs* em intervalos de 5 ou 3 minutos. Ao fim da injeção do volume da solução de CPC, outra alíquota de água deionizada foi passada na coluna a fim de retirar a CPC não adsorvida da coluna. Após esse processo prosseguiu-se com a etapa de eluição, com solução de NaCl 4,0% m/V como eluente. As frações coletadas foram analisadas via espectrofotometria no UV-Visível em $\lambda = 260$ nm. O comprimento de onda foi escolhido com base nas observações de Abraham e Newton (1961) durante seus estudos acerca da elucidação estrutural da CPC.

Além dos cromatogramas mostrando o perfil de eluição da CPC, foram realizados também experimentos para gerar as curvas de ruptura da CPC na resina. Esses experimentos foram realizados usando-se iguais volumes de solução de CPC de mesma concentração enquanto variava-se a vazão do processo em 3 diferentes valores. Os procedimentos de condicionamento da coluna, injeção da amostra, eluição, coleta das frações e análise dos coletados no UV/Vis foram realizados da mesma forma descrita anteriormente nos experimentos para obtenção do perfil de eluição da CPC.

Para realizar o experimento de melhoramento do perfil de eluição da CPC, e os experimentos de avaliação da influência do controle de temperatura e de vazão sobre as curvas de ruptura, foi utilizada uma coluna encamisada acoplada a um banho termostático e a uma bomba peristáltica. Para o experimento de melhoramento de eluição da CPC foi escolhida a concentração de $4,0 \cdot 10^{-2} \text{ g.L}^{-1}$. Já que o perfil obtido nesta concentração se mostrou o melhor nos ensaios anteriores. Em um leito de 10,0 cm de altura com temperatura de 25°C e vazão do sistema de $4,0 \text{ mL.min}^{-1}$. A resina foi pré-condicionada seguindo o processo descrito anteriormente. As condições usadas são apresentadas na Tabela 6. As condições usadas nos experimentos de ruptura com controle de temperatura e vazão podem ser observadas na Tabela 7. Nessa série de experimentos novamente foram avaliados os valores de vazão usados anteriormente, 3,0, 4,0 e $5,0 \text{ mL.min}^{-1}$, mantendo a temperatura constante a 25°C. O valor de concentração de CPC foi escolhido com base nos resultados do experimento de melhoramento do perfil de eluição.

Tabela 6 - Parâmetros experimentais para melhoramento da eluição da CPC.

| Parâmetros | Valor |
|--------------------|--|
| Solução de CPC | 200 mL, $C_0=4,0 \cdot 10^{-2} \text{ g.L}^{-1}$ |
| Temperatura | 25°C |
| Vazão | 4,0 mL.min ⁻¹ |
| Altura do leito | 10,0 cm |
| Solução de lavagem | 200 mL Água destilada |
| Solução de eluição | 200 mL de NaCl 4% m/V |

Tabela 7 – Condições usadas para a obtenção das curvas de ruptura com controle de vazão e temperatura.

| Experimento | Altura do leito | Alimentação | Vazão | Eluição |
|-------------|-----------------|---|------------|---|
| 7 | 10 cm | 200 mL de CPC $4,0 \cdot 10^{-2} \text{ g/L}$ | 3,0 mL/min | Modo isocrático com solução de NaCl 4,0% m/V. |
| 8 | 10 cm | 200 mL de CPC $4,0 \cdot 10^{-2} \text{ g/L}$ | 4,0 mL/min | |
| 9 | 10 cm | 200 mL de CPC $4,0 \cdot 10^{-2} \text{ g/L}$ | 5,0 mL/min | |

Os cálculos utilizados para obtenção dos parâmetros da coluna foram feitos seguindo as metodologias propostas por Geankoplis (2003) e Cren *et al* (2009). A capacidade total do leito é obtida através da equação 5, em que t_t é o tempo referente à capacidade total ou estequiométrica do leito e t_e é o primeiro instante em que C/C_0 é igual a 1. A capacidade usada do leito é obtida no ponto de ruptura quando $C/C_0 = 0,05$ a $0,1$, neste trabalho o valor do ponto de ruptura será adotado quando $C/C_0=0,1$. E pode ser calculada a partir da equação 6. Sendo t_u é o tempo correspondente ao ponto de ruptura. Idealmente t_u é muito próximo de t_b que é o tempo onde surge o ponto de ruptura. A fração utilizada do leito durante o processo é dada pela razão t_u/t_t . A altura total do leito é dada por H_t . Então a altura do leito utilizada H_u , pode ser obtida através da equação 7. A altura não utilizada H_{un} , é dada por:

$$t_t = \int_0^{t_e} \left(1 - \frac{c}{c_0}\right) dt \quad (5)$$

$$t_u = \int_0^{t_b} \left(1 - \frac{c}{c_0}\right) dt \quad (6)$$

$$H_u = \frac{t_u}{t_t} \cdot H_t \quad (7)$$

$$H_{un} = \left(1 - \frac{t_u}{t_t}\right) \cdot H_t \quad (8)$$

A partir dos valores obtidos da curva de ruptura, podem-se calcular os fatores ϵ_f , ϵ_r e P, que são respectivamente, eficiência de uso do leito, eficiência de recuperação do produto e produtividade da coluna. Segundo a metodologia proposta por Cren *et al* (2009), esses parâmetros estão relacionados com a eficiência do processo de recuperação como um todo, para a realização destes cálculos a área da curva de ruptura é dividida em três regiões, sendo que a região A_1 é referente a capacidade do leito utilizada até o ponto de ruptura, e é definida do ponto de entrada da coluna até o ponto de ruptura. A região A_2 é referente à quantidade de soluto que deixa a coluna sem ser adsorvido até o ponto de ruptura, e por último, A_3 está relacionada à capacidade do leito usada após o ponto de ruptura e é definida do ponto de ruptura até o ponto onde $C/C_0 \sim 1$. A eficiência ϵ_r está relacionada à remoção de soluto, e ϵ_f a eficiência de utilização da resina. As equações 9 a 11 mostram a obtenção das eficiências relacionadas ao processo de coluna, nas quais Q é a vazão volumétrica do soluto durante a corrida cromatográfica e C_0 é a concentração inicial do soluto.

$$\epsilon_r = \frac{t_u}{t_b} = \frac{A_1}{A_1 + A_2} \quad (9)$$

$$\epsilon f = \frac{t_u}{t_t} = \frac{A_1}{A_1 + A_2} \quad (10)$$

$$P = \frac{t_u}{t_e} \cdot C_0 \cdot Q \quad (11)$$

Para a obtenção da curva de cinética de adsorção da CPC na resina IRA 410, usou-se uma metodologia baseada no estudo de Barboza e Hokka (2003), em que usou-se uma quantidade de 8,026 g de resina pré-condicionada e 100 mL de uma solução de CPC $4,06 \cdot 10^{-2} \text{ g.L}^{-1}$ com pH ajustado em 3,6, o sistema foi vedado e mantido em agitação constante, a uma temperatura de 30°C. Em intervalos de tempo de 2 minutos foram coletadas alíquotas da solução para análise quantitativa através de espectroscopia no Uv/Vís. O experimento foi conduzido até que o sistema entrasse em equilíbrio e não fosse evidenciada variação no valor da concentração da CPC. Para análise do resultado foi traçado um gráfico de C/Co em função do tempo, onde C é a concentração de CPC em um determinado tempo e Co a concentração inicial de CPC. Depois disso, com o auxílio do programa Origin 8®, os dados foram ajustados a modelos cinéticos de primeira e segunda ordem a fim de saber qual modelo representa melhor a cinética de adsorção da CPC na resina IRA. As equações 12 e 13 foram utilizadas como base para a modelagem.

$$\ln [A] = -kt + \ln [A]_0 \quad (12)$$

$$\frac{1}{[A]} = \frac{1}{[A]_0} + kt \quad (13)$$

Para a obtenção da isoterma de adsorção da CPC na resina IRA 410 foram pesadas massas constantes de resina da ordem de 0,5 g em béqueres e quatro soluções de diferentes concentrações de CPC (10,4, 30,2, 44,1 e 58,1mg.L⁻¹) foram colocadas em contato com a resina. O sistema resultante foi vedado, mantido em agitação constante e temperatura de 30°C durante uma hora, tempo necessário para o sistema entrar em equilíbrio. Após este período foram retiradas alíquotas para análise da concentração de equilíbrio na fase líquida, que foram quantificadas por espectroscopia no Uv/Vís. Os experimentos de isoterma cada concentração foi avaliada em triplicata. O resultado do experimento de isoterma foi analisado através de um gráfico de q* (Concentração de equilíbrio na fase sólida) em função de Cf* (concentração de equilíbrio na fase líquida). O Cf* pode ser obtido diretamente através da leitura em UV/Vís das frações coletadas ao fim do experimento. Já q* é determinado através da equação 5, mostrada a seguir, sendo Co é a concentração inicial de CPC na fase líquida, m é a massa de resina e Vs é o volume de solução de CPC. Após a obtenção da curva, a mesma foi ajustada ao modelo linear de isoterma com o auxílio do programa Origin 8® e para a obtenção do parâmetro k, importante para descrever o processo de adsorção da CPC na resina, o modelo linear foi escolhido pelo fato de se ter trabalhado com soluções de CPC diluídas.

$$q^* = \frac{C_0 - C_f^*}{m} \cdot V_s \quad (13)$$

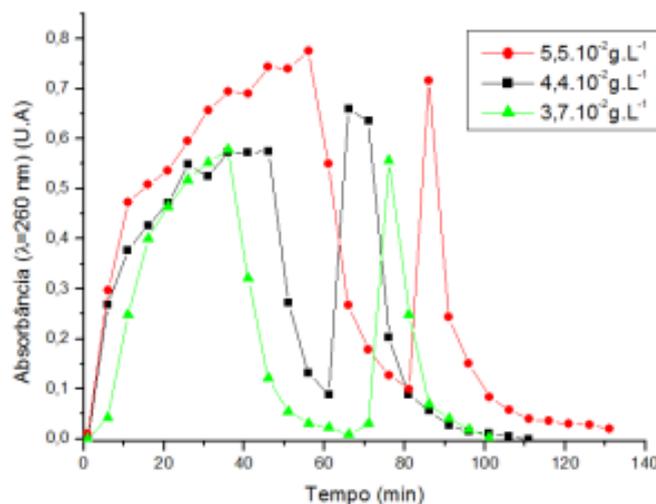
Com o objetivo de separar a CPC de uma solução contendo metionina como contaminante o seguinte experimento foi realizado. Para tanto utilizou-se uma solução de concentração $4,9 \cdot 10^{-2} \text{ g.L}^{-1}$ de CPC e de mesma concentração para a metionina, para simular uma condição extrema em que o contaminante possui concentração igual a da substância de interesse. O caldo teve o pH ajustado em 3,6 com o auxílio do tampão Ác. Succínico/KOH. A coluna cromatográfica foi recheada com a resina IRA410 e pré-condicionada como já descrito anteriormente. O experimento foi realizado a vazão constante de 4,0 mL.min⁻¹ e temperatura de 25°C. O ensaio cromatográfico foi realizado injetando-se 100 mL de solução contendo a CPC com a metionina, seguida de 15 minutos de lavagem com água. A eluição neste experimento foi realizada no modo gradiente degrau com soluções a 0,1, 0,5, 1,0 e 4,0% m/V de cloreto de sódio. Na literatura (SACCO; DELLACHERIER, 1981) os autores empregam essa metodologia para promover a separação de aminoácidos da CPC em colunas recheadas com resinas neutras modificadas. A obtenção dos cromatogramas foi realizada de duas formas diferentes. Para a CPC foi realizada a leitura em

UV/visível em comprimento de onda de 260 nm. Os resultados foram lançados em uma curva de calibração previamente obtida e a concentração obtida foi graficada em função do tempo. Nesta metodologia observa-se que a metionina não apresenta absorção significativa neste comprimento de onda e, portanto, não influencia nos valores de concentração de CPC obtidos. O aminoácido metionina é considerado um contaminante na separação da CPC do caldo fermentativo por isso foi feita a quantificação desse aminoácido por HPLC. As análises foram feitas pelo Grupo de Bioquímica do Departamento de Engenharia Química da UFSCar. Utilizou-se um cromatógrafo com detector de arranjo de diodos (Waters 996 – PDA), uma coluna de fase reversa (μ -Bondapak C18 - 3,9 x 300 mm) e o equipamento foi operado dentro das seguintes condições: vazão de $2,5 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, temperatura de 28°C e os picos foram detectados em 220 nm. Cada fração coletada no ensaio em coluna foi injetada no HPLC separadamente e cada cromatograma obtido foi usado para a obtenção do gráfico correspondente ao ensaio completo, lançando os resultados individuais das amostras em função do tempo de coleta.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nos experimentos iniciais os perfis de eluição da CPC foram obtidos em três diferentes valores de concentração, $3,7$, $4,4$ e $5,5 \cdot 10^{-2} \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, respectivamente. A variação da concentração da CPC foi realizada a fim de verificar se essa variável exerce alguma influência no perfil de eluição da molécula no leito recheado com a resina IRA 410. Os cromatogramas obtidos podem ser observados na figura 14. As medidas de absorbância foram realizadas em $\lambda = 260 \text{ nm}$. A eluição realizada com solução de NaCl a $4,0\% \text{ m/V}$ mostrou-se satisfatória, indicando que esta solução pode ser usada com eficiência nesta situação, sem a necessidade do uso da eluição por gradiente que é uma maneira mais trabalhosa de se realizar esta etapa do processo. A escolha deste eletrólito como eluente foi feita com base nas observações de Stables e Briggs (1980) e também no trabalho de Oliveira (2013).

Figura 14 – Comparativo dos cromatogramas da CPC nas diferentes concentrações estudadas.

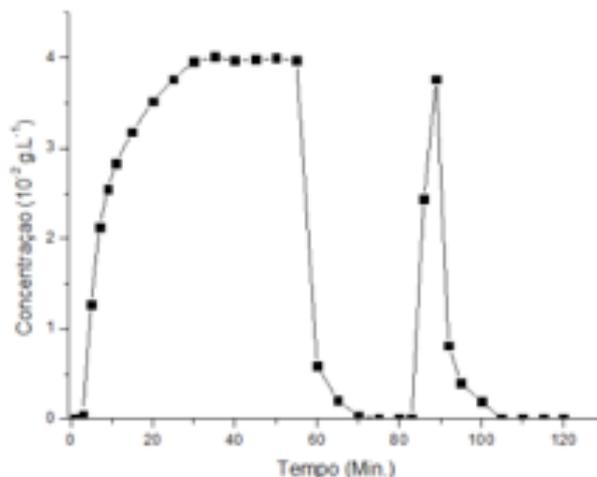


Os máximos valores de absorção encontrados geraram valores de concentração de CPC um pouco abaixo daquela inicialmente injetada. Isso pode ter ocorrido por não ter sido possível coletar uma fração que representasse o máximo de absorção devido ao tempo de coleta das frações previamente definido, ou ainda por parte da CPC ficar fortemente adsorvida à resina mesmo após a aplicação da solução eluente. Pode ser observado também que com o aumento da concentração da solução de alimentação os picos eluídos aumentaram de intensidade como era de se esperar, devido à proporcionalidade entre esses parâmetros quando a quantidade de solução de alimentação injetada é a mesma. Os cromatogramas mostraram também, em todas as concentrações estudadas, um alargamento da cauda do pico da CPC. Segundo Collins (2006), esse comportamento pode ocorrer devido à uma alta afinidade entre a CPC e a resina, fazendo com que o processo de dessorção não ocorra idealmente. A solução eluente também afeta nessa situação e a modificação de sua força pode melhorar os picos. Outro ponto que pôde ser observado nos cromatogramas é que a etapa de lavagem após a saturação do leito não foi realizada de forma satisfatória quando a concentração de CPC na solução de alimentação aumentou, visto que houve absorção

significativa nas frações coletadas nesta etapa para as concentrações de 4,4 e $5,5 \cdot 10^{-2} \text{ g.L}^{-1}$ de CPC. Apenas na concentração mais baixa aplicada, a etapa de lavagem foi realizada de forma eficiente, pois a absorvância atingiu praticamente zero, mostrando que o material não adsorvido que se encontrava na coluna foi totalmente retirado. Esses resultados mostram que é necessário aumentar o tempo de limpeza da coluna após a saturação do leito antes de promover a eluição do composto. Tomando-se por base o máximo de absorvância do pico como referência para se determinar o tempo de retenção, houve variação máxima de cerca de 20 minutos entre as três concentrações estudadas. A existência desta diferença de tempo de retenção não pode ser atribuída à variação da concentração já que se observa que não há relação entre o aumento da concentração e aumento de tempo ou aumento de concentração e diminuição de tempo. O comportamento se mostra aleatório e pode, talvez, ser atribuído às condições operacionais que não puderam ser controladas, como a temperatura, (Que influencia diretamente no processo de adsorção/dessorção do composto) e a vazão do sistema. A falta de controle dessas variáveis ocorreu, pois, nesta etapa o arranjo experimental usado foi bastante simples, composto apenas por uma bureta usada como leito, sendo a vazão ajustada na torneira da mesma e a temperatura seguindo a temperatura do ambiente, já que a bureta não possuía sistema de controle de temperatura.

Assim, foram realizadas modificações no processo a fim de se obter um melhor perfil de eluição da CPC. Nesta etapa, o arranjo experimental usado foi mais complexo, a coluna usada era encamisada e acoplada a um banho termostático com controlador eletrônico de temperatura e a vazão do sistema foi controlada com uma bomba peristáltica. As medidas de absorvância foram realizadas em espectrofotômetro UV/Visível em $\lambda = 260 \text{ nm}$. O resultado pode ser observado na Figura 15.

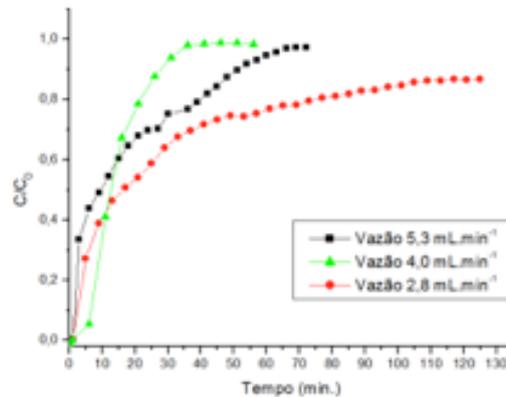
Figura 15 – Perfil de eluição da CPC após tentativa de melhoria do processo.



O perfil de eluição da CPC obtido mostra a região de adsorção atingindo a concentração de alimentação inicial de $4,0 \cdot 10^{-2} \text{ g.L}^{-1}$, seguido de uma etapa de lavagem realizada de forma eficiente devido ao aumento da quantidade de água injetada após a alimentação. O aumento do tempo de lavagem fez com que a concentração de CPC atingisse zero, mostrando que todo o material não adsorvido foi eliminado do interior do leito. A eliminação de todo material não adsorvido é necessária, pois, o mesmo pode influenciar na etapa posterior de eluição, podendo causar desvios nos resultados de concentração do pico de interesse. A eluição realizada novamente com a solução de cloreto de sódio a 4,0% m/V, mostrou-se satisfatória, sendo que, assim que aplicada já fez com que a CPC fosse dessorvida do leito. A diminuição do tamanho do leito fez com que o pico se tornasse mais estreito, já que inicialmente a CPC era coletada em um intervalo inicial de cerca de mais de 30 minutos e depois dessa ação o pico foi coletado em um intervalo de frações de 20 minutos. O máximo do pico de CPC eluído teve concentração um pouco abaixo da concentração inicialmente injetada, mostrando que os intervalos de coleta podem ter influenciado novamente, deixando o ponto máximo passar sem ter sido coletado em nenhuma fração, fazendo ocorrer este resultado. Porém, observou-se que o controle de temperatura não fez com que a cauda do pico desaparecesse. Outra maneira de tentar fazer com que o pico tenha melhor aparência seria alterar as características da solução de eluição sendo que os parâmetros que podem ser alterados são o pH e a concentração da mesma.

Após obter o perfil de eluição da CPC na coluna recheada com a resina IRA 410 e verificar que houve boa interação entre o antibiótico e a resina, partiu-se para a etapa de levantamento das curvas de ruptura. Através das curvas de ruptura é possível se obter uma série de informações acerca do processo, como descrito na seção de metodologia. Além disso, as curvas de ruptura servem também como base para se realizar o aumento de escala do mesmo. As curvas de ruptura foram obtidas com base na metodologia de Geankoplis (2003) onde a razão entre a concentração final sobre a inicial é registrada em função do tempo de corrida. apesar de que neste valor de vazão o tempo gasto para atingir o ponto de ruptura foi maior do que nos outros ensaios e podem ser observadas na Figura 16.

Figura 16 – Comparativo das curvas de ruptura da CPC nas vazões de 2,8, 4,0 e 5,3 mL.min⁻¹.



O tempo necessário para se atingir o ponto de ruptura onde $C/C_0 = 0,1$ foi rápido variando entre 1 a 6 minutos para as vazões utilizadas, significando que a vazão não exerceu influência significativa sobre esse ponto. Para as vazões de 2,8 e 5,3 mL.min⁻¹ o ponto de ruptura ocorreu praticamente ao mesmo tempo entre 1,5 a 2,5 minutos. Já para a vazão de 4,0 mL.min⁻¹, o ponto demorou um pouco mais para ocorrer em cerca de 6 minutos. O tempo necessário para se obter valores de C/C_0 próximos da unidade foi menor quando a vazão do sistema foi mantida em 4,0 mL.min⁻¹, nas outras vazões o tempo decorrido para que isso ocorresse foi maior, portanto, não houve evidência de uma relação entre vazão de operação do sistema e o tempo de saturação do leito. Outro fato observado é que em nenhuma das vazões foi possível obter $C/C_0 = 1$. Os valores mais próximos encontrados foram, 0,932, 0,984 e 0,868 para os valores de vazão de 5,3, 4,0 e 2,8 mL.min⁻¹, respectivamente. Na vazão de 2,8 mL.min⁻¹, os valores de C/C_0 ficaram bem abaixo da unidade apesar do longo tempo de saturação. Já nas vazões de 5,3 e 4,0 mL.min⁻¹, os valores obtidos foram próximos a 1, sendo que o maior valor de 0,984 foi encontrado para este último valor de vazão, apesar de que neste valor de vazão o tempo gasto para atingir o ponto de ruptura foi maior do que nos outros ensaios. As curvas obtidas não seguiram um padrão de formato e também não apresentaram relação entre a variação de vazão e o surgimento do ponto de ruptura, ou relação da vazão com o tempo onde $C/C_0 \sim 1$. Alguns fatores podem ter influenciado neste comportamento aleatório apresentado. Devido a questões de ordem técnica, a temperatura do ambiente em torno da coluna não pôde ser controlada, além disso, os ensaios para cada vazão foram realizados em dias diferentes. A falta de controle da temperatura aliada à variação climática de um dia para o outro e até mesmo a variação ocorrida durante cada experimento pode ter influenciado no comportamento do processo já que a temperatura é um fator determinante em processos de adsorção. Segundo Collins (2006) a variação da temperatura pode influenciar nas interações entre a molécula alvo e o adsorvente e assim alterar o processo de adsorção. Nos trabalhos encontrados na literatura onde são realizados experimentos para observar o comportamento de processos de adsorção (BARBOZA; HOKKA; MAUGERI, 2002; BARBOZA; ALMEIDA; HOKKA, 2003) nota-se que a temperatura é sempre controlada durante o experimento. O controle de temperatura durante a cromatografia em coluna pode ser realizada usando colunas encamisadas que permitem a passagem de água com temperatura controlada através de banhos termostatizados, como observado no trabalho de Oliveira (2013). Neste, a autora estuda o processo de purificação da Cefamicina C e busca avaliar o processo de adsorção deste antibiótico em colunas de leito fixo. Barboza, Almeida e Hokka (2003) estudaram o efeito da temperatura no processo de adsorção do ácido clavulânico na resina IRA 400 e mostram que esse fator influencia no processo de dessorção da molécula, que é facilitado pelo aumento da temperatura. Apesar da não uniformidade apresentada pelas curvas de ruptura obtidas foi possível calcular

os parâmetros do processo em coluna para cada vazão segundo a metodologia proposta por Cren *et al.* (2009) e por Geankoplis (2003). Os resultados são vistos na Tabela 8.

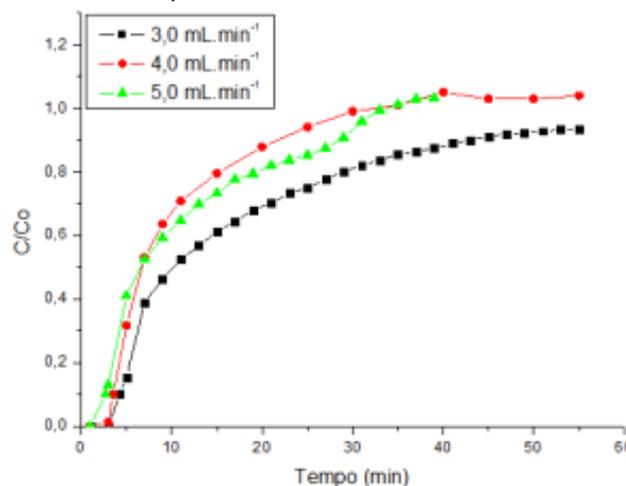
Tabela 8 – Parâmetros da coluna nas três vazões estudadas.

| Parâmetro/Vazão | 2,8 mL/min | 4,0 mL/min | 5,3 mL/min |
|------------------|------------|------------|------------|
| Tt (min) | 25,612 | 14,812 | 18,698 |
| Te (min) | 61 | 36 | 72 |
| Tu (min) | 2,3746 | 6,4757 | 1,62485 |
| Tb (min) | 2,44 | 6,72 | 1,65 |
| ϵ_r (%) | 97,3 | 96,4 | 98,5 |
| ϵ_f (%) | 9,3 | 43,7 | 8,7 |
| P (mg/min) | 0,043 | 0,061 | 0,051 |
| Ht (cm) | 16,5 | 16,5 | 16,5 |
| Hb (cm) | 1,53 | 7,21 | 1,43 |
| Hu (cm) | 14,97 | 9,29 | 15,07 |

As eficiências de remoção do soluto (ϵ_r) calculadas atingiram níveis satisfatórios para todas as vazões estudadas. Foram obtidos valores de eficiência acima de 95%, mostrando que a resina foi capaz de reter a CPC da solução de alimentação. Já as eficiências (ϵ_f) relacionadas ao uso da capacidade do leito apresentaram valores baixos. Essas eficiências apresentaram os valores de 9,3, 43,7 e 8,7% para os valores de vazão de 2,8, 4,0 e 5,3 mL.min⁻¹, respectivamente. Notou-se durante os cálculos que o fator A_3 , obtido segundo a metodologia proposta por Cren *et al.* (2009), e usado no cálculo da eficiência de uso do leito, apresentou altos valores para todas as vazões. Esse fator, segundo a autora, está relacionado com a parte do leito que não é usada de forma eficiente, já que parte da adsorção ocorre entre o ponto de ruptura e o ponto onde $C/C_0 \sim 1$. Segundo Geankoplis (2003), essa região da curva, conhecida como zona de transferência de massa, quanto mais estreita e íngreme gera melhor uso do leito. Dessa forma, algum processo paralelo pode estar ocorrendo, como a formação de canais preferenciais, que impedem o uso do leito seja mais eficiente durante o processo. Comparando com o trabalho de Oliveira (2013) onde a autora usa a mesma metodologia para obter os parâmetros da coluna recheada com a resina Sepharose QXL na purificação da Cefamicina C, molécula bem parecida com a CPC, os resultados mostram tanto a remoção eficiente do soluto, quanto o uso eficiente do leito. Todos os valores obtidos foram acima dos 95%. Nota-se que as curvas de ruptura obtidas pela autora em diferentes vazões mostram perfis semelhantes entre si, e também se mostram bem íngremes e estreitas na região que vai do ponto de ruptura ao valor de $C/C_0 \sim 1$ (zona de transferência de massa). A região referente a A_3 nas curvas da autora exibem baixos valores, refletindo em altas eficiências de uso do leito. Quanto à altura do leito usado nesse trabalho, observaram-se valores bem baixos em relação à altura total do leito para as três vazões estudadas, e por consequência, os valores de altura não usada do leito foram bem próximos ao valor de altura total do leito. O fato de grande parte da altura do leito não ter sido usado pode indicar que a coluna suporta maior quantidade de CPC. Esses resultados vão de encontro aos baixos valores de eficiência de uso do leito obtidos a partir das áreas das curvas de ruptura. Apenas na vazão de 4,0 mL.min⁻¹ nota-se o uso de 7,21 cm da altura do leito, eficiência de uso de 43,7% porém, como a forma da curva de ruptura nesta vazão apresentou considerável diferença das demais não é possível concluir se o valor de eficiência de uso do leito e altura de leito usada são devido ao valor da vazão ser o ideal para operação nas condições usadas ou se ocorreu algum erro que levou aos resultados obtidos. Os tempos t_t e t_e se mostraram muito diferentes para todas as vazões, sendo que a literatura indica que em situações favoráveis t_t e t_e devem exibir valores próximos. Por outro lado, os tempos t_u e t_b , apresentaram valores próximos. Esse comportamento é o encontrado na literatura, que diz que t_u e t_b devem exibir valores próximos (GEANKOPLIS, 2003; OLIVEIRA, 2013). Os valores das produtividades foram baixos para todas as vazões estudadas. O valor deste parâmetro é diretamente proporcional à relação entre t_t e t_e , como nos experimentos os valores de t_e foram altos em relação aos de t_t , devido a grande zona de transferência de massa exibida nas curvas, as relações entre os tempos para cada vazão foram baixos, acarretando em baixos valores obtidos para as produtividades. Os valores de eficiência de uso do leito, tamanho usado do leito e o formato da curva obtidos a vazão de 4,0 mL.min⁻¹ foram muito diferentes dos valores obtidos para outras vazões. Isso pode ter sido causado pela falta de controle na temperatura e na vazão dos experimentos, causando diferenças nos resultados obtidos.

A fim de verificar se a temperatura e a vazão influenciaram de alguma forma o processo de adsorção na coluna, os experimentos de obtenção das curvas de ruptura foram repetidos. A temperatura do sistema pode influenciar os processos de adsorção e dessorção da molécula na resina, acelerando ou desacelerando alguma dessas etapas e assim alterar a forma das curvas de ruptura. Barboza, Almeida e Hokka (2003) trabalhando com a adsorção do ácido clavulânico em resinas tipo XAD, observaram que o aumento da temperatura favoreceu a dessorção da molécula da resina. Como no presente trabalho a vazão era controlada manualmente usando uma bureta, pode ter ocorrido algum erro associado a este parâmetro durante a execução do experimento, podendo causar erros principalmente quanto ao surgimento do ponto de ruptura. Os baixos valores de eficiência de uso do leito e altura usada podem estar associados ao uso de um leito muito grande para a concentração de CPC usada. Nesta nova etapa, a temperatura foi controlada com o auxílio de uma coluna encamisada acoplada a um banho termostatizado. A vazão foi controlada através de uma bomba peristáltica conectada à entrada da coluna. Os experimentos foram realizados nas mesmas condições iniciais, variando a vazão em 3,0, 4,0 e 5,0 mL.min⁻¹ e mantendo a concentração de CPC a 4,0.10⁻² g.L⁻¹ e a temperatura constante 25°C. Outra modificação feita foi diminuir o tamanho do leito, visando aumentar a eficiência de uso do leito e a altura usada de forma eficiente. Na figura 17, as curvas de ruptura obtidas com o controle de temperatura e vazão podem ser observadas.

Figura 17: Comparativo das curvas de ruptura com controle de temperatura e vazão.



De início pôde ser observado que mesmo com o controle da temperatura e da vazão, as curvas não apresentaram um formato ideal como o visto na literatura (GEANKOPLIS, 2003). Novamente a zona de transferência de massa, região que se estende do ponto de ruptura até C/Co, se mostrou muito extensa e a região associada ao fator A₃ novamente teve altos valores, diferentemente do comportamento ideal. Esse fato indica que os parâmetros não controlados inicialmente não influenciaram no formato não ideal das curvas e que esses formatos obtidos representam realmente o processo de adsorção da CPC na resina IRA 410 nas condições de operação adotadas. No trabalho de Lee e Moon (1999) os autores trabalham com o efeito do pH na adsorção da CPC na resina neutra SP850. Os autores relatam que adsorção da CPC nesta resina depende fortemente do pH, já que a mudança do mesmo faz com que CPC se apresente de diferentes formas devido a sua natureza anfótera e essas diferentes formas fazem com que a CPC tenha sua afinidade com a resina alterada. Um dos efeitos que chamaram a atenção dos autores é que quando pH é colocado em baixos valores as curvas de ruptura têm suas formas alteradas, se mostrando em formas características de sistemas multicomponentes. Nas curvas obtidas para pH em torno 3,5 os autores obtiveram curvas de ruptura onde o formato apresenta desvios do formato ideal. Nessas curvas também nota-se que C/Co não atinge valor de 1. Os autores atribuem esses comportamentos ao fato de que nem todas as moléculas estão na forma iônica, forma essa favorável para que haja interação com a resina. Este fato também pode explicar o formato das curvas obtidas no presente trabalho e também o fato de nem todas as curvas atingirem o valor de C/Co=1, já que no pH de 3,6 nem toda a CPC está na forma aniônica, o que seria o necessário para ocorrer a adsorção por troca aniônica com a resina IRA410. Os pontos de ruptura surgiram mais rapidamente de acordo com o aumento da vazão. Este tipo de comportamento é o esperado, já que o aumento da vazão faz com que o mesmo tamanho de leito receba maior volume de solução de alimentação em um mesmo tempo sendo saturado mais rapidamente. Na etapa anterior, o ponto

de ruptura referente à vazão de $4,0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ havia saído por último, nesta nova etapa os pontos de ruptura seguiram a tendência normal. No trabalho de Oliveira (2013) em que a autora obtém as curvas de ruptura da Cefamicina C em colunas recheadas com a resina de troca iônica Sephadex QLX, o comportamento do surgimento dos pontos de ruptura também se deu dessa forma, aparecendo em menores tempos com o aumento da vazão. É possível observar também que apesar do surgimento do ponto de ruptura acontecer mais rapidamente em maiores valores de vazões, as diferenças entre os tempos de surgimento nas três vazões não foram significativas, isso indica que o sistema pode ser operado em qualquer dos três valores sem que haja perdas significativas em termos econômicos, os valores de surgimento dos tempos de ruptura variaram entre 2,5 a 5 minutos. Este comportamento pode ser atribuído ao uso do controle de vazão, já que anteriormente, sem o uso do controle, não foi observada a relação correta entre o aumento da vazão e o surgimento do ponto de ruptura. Outro ponto observado é que nas vazões de $4,0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ e $5,0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ foi possível atingir $C/Co=1$, enquanto na vazão de $3,0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ o máximo atingido foi de $C/Co=0,935$. Esse comportamento também foi observado nas curvas de ruptura obtidas inicialmente, onde nas maiores vazões foi possível obter C/Co bem próximos à unidade e na vazão mais baixa C/Co atingiu o valor máximo de 0,868. Nesta etapa, os controles de temperatura e vazão possibilitaram que fossem atingidos maiores valores de C/Co , já que anteriormente apesar da proximidade dos valores à unidade, nenhum atingiu o valor de $C/Co=1$, como ocorreu quando os experimentos foram realizados com esses controles. A fim de comparação foram calculados também os parâmetros da coluna para os experimentos realizados com os controles de temperatura e vazão. Os resultados são mostrados na Tabela 9.

Os cálculos dos parâmetros do processo em coluna para os experimentos com controle de temperatura e vazão mostraram primeiramente que os pares de tempos t_t e t_e novamente apresentaram diferenças significativas em seus valores, mesmo com a diminuição do leito de 16,5 para 10,0 cm. Porém, essa diferença do par de tempos foi menor do que aquela apresentada entre o mesmo par de tempos dos ensaios iniciais. Ou seja, a diminuição do tamanho do leito mostra que há uma tendência na aproximação dos tempos t_t e t_e . O par t_u e t_b manteve o comportamento anterior, de valores bem próximos.

Tabela 9- Parâmetros da coluna para os experimentos realizados com controle de temperatura e vazão.

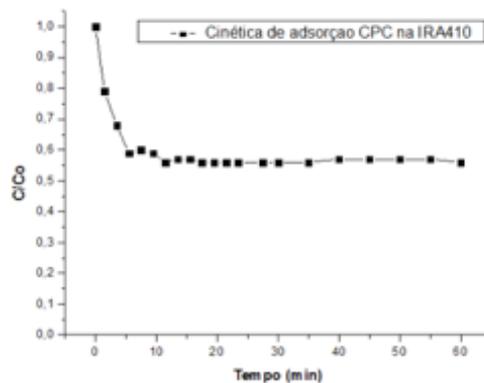
| Parâmetro/Vazão | 3,0 mL/min | 4,0 mL/min | 5,0 mL/min |
|------------------|------------|------------|------------|
| Tt (min) | 16,424 | 9,733 | 12,907 |
| Te (min) | 45 | 30 | 33 |
| Tu (min) | 4,235 | 3,5167 | 2,625 |
| Tb (min) | 4,30 | 3,56 | 2,71 |
| ϵ_r (%) | 98,5 | 98,8 | 96,9 |
| ϵ_f (%) | 25,8 | 36,1 | 20,3 |
| P (mg/min) | 0,044 | 0,052 | 0,078 |
| Ht (cm) | 10,0 | 10,0 | 10,0 |
| Hb (cm) | 2,58 | 3,61 | 2,03 |
| Hu (cm) | 7,42 | 6,39 | 7,97 |

A eficiência ϵ_r relacionada à capacidade do leito de remover o soluto continuou apresentando valores acima de 95%, como anteriormente, sendo que o maior valor atingido foi de 98,8%, quando a vazão do sistema foi de $4,0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$. Os valores obtidos foram satisfatórios, mostrando que a resina IRA 410 interage bem com CPC. Já a eficiência ϵ_f relacionada ao uso eficiente do leito, continuou apresentando valores considerados baixos. Porém, em comparação aos valores anteriormente obtidos, nota-se que houve um aumento significativo principalmente entre as vazões de $2,8 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ inicial e $3,0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ neste experimento, saltando de 9,3 para 25,8%, e entre as vazões $5,3 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ inicial e $5,0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ neste experimento, saltando de 8,7 para 20,3%. Para vazão de $4,0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ inicial para $4,0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ deste experimento, houve a redução de valor de 43,7% para 36,1%. Os relativos aumentos podem estar associados ao menor tamanho de leito utilizado, já que essa eficiência está diretamente relacionada aos parâmetros de tempos e áreas que foram melhores com a diminuição do leito. O decaimento da eficiência para vazão de $4,0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ mostra que pode realmente ter ocorrido erro no experimento inicial, porém, observa-se também que apesar da suspeita do erro inicial, novamente nesta vazão foi obtido o maior valor de eficiência do uso do leito, indicando também que esta pode ser vazão ideal para trabalhar nas condições

deste trabalho. As alturas usadas dos leitos também foram maiores do que as apresentadas inicialmente quando comparadas aos respectivos pares. Esse fato mostra que a diminuição do tamanho leito surtiu um leve efeito e se mostra como possível caminho para aumentar a eficiência de uso do leito. Observa-se também que o maior valor de uso do leito foi obtido para a vazão de $4,0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, reforçando a ideia de que este valor de vazão pode ser o melhor para operar o sistema. As produtividades obtidas não foram significativamente maiores do que as obtidas inicialmente, isso se deve ao fato da dependência deste parâmetro da relação entre t_i e t_e , que continuou baixa devido a grande diferença entre esse par de tempos. Observou-se também o aumento proporcional da produtividade de acordo com o aumento da vazão do sistema. Os resultados obtidos indicam que para os trabalhos futuros a escala da coluna pode ser projetada para diminuir ainda mais o tamanho do leito e quantidade de resina, ou ainda, aumentar a concentração da CPC na solução de alimentação mantendo-se o tamanho do leito, a temperatura constante. E assim identificar se de fato o tamanho do leito é o principal influente nos valores de eficiência de uso do leito e altura usada. Outro ponto que pode ser abordado é se variação de temperatura pode alterar a forma das curvas de ruptura, melhorando-as.

A fim de estudar o comportamento da CPC na resina IRA410 foram realizados experimentos acerca da cinética e da isoterma de adsorção. Primeiramente para se obter indicações de como ocorre a variação da concentração de CPC ao longo do tempo e também de possíveis mecanismos foi realizado o experimento de cinética. O resultado obtido é mostrado na Figura 18. Nota-se primeiramente que o processo entra em equilíbrio em curto período de tempo, já que em cerca de 5,5 minutos já não é possível notar mais variação na relação entre as concentrações inicial e final. Até o fim do experimento em 60 minutos a relação entre as concentrações manteve-se constante, indicando que realmente o sistema atingiu o equilíbrio. Nota-se também que a resina foi capaz de adsorver aproximadamente 45% da CPC da alimentação inicial, já que no equilíbrio C/C_0 atingiu o valor de 0,55.

Figura 18 – Cinética de adsorção da CPC na resina IRA410 a 30°C .

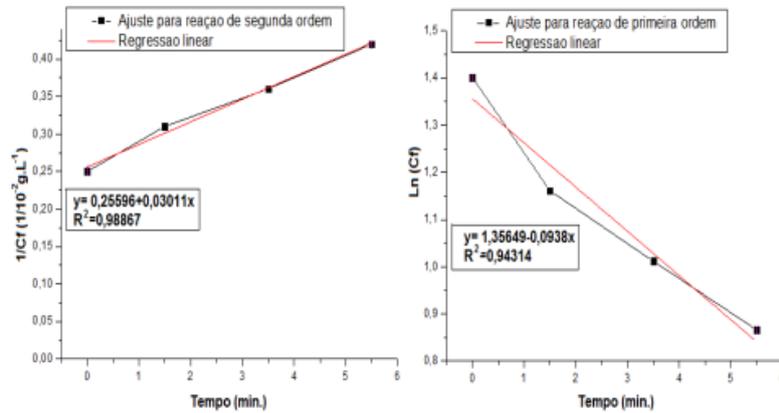


Para obter parâmetros quantitativos e propor algum mecanismo para o processo de adsorção da CPC na resina IRA410 a curva de cinética foi ajustada a modelos de reação de primeira e segunda ordem. Para obtenção do modelo de primeira ordem foi traçado um gráfico do logaritmo natural da concentração final ($\ln(C_f)$) em função do tempo (t), sendo que, o intervalo de tempo usado foi do início do processo até o tempo onde o sistema atinge o equilíbrio em 5,5 minutos. Já para o ajuste de segunda ordem, traçou-se um gráfico de um sobre a concentração final de CPC ($1/C_f$) em função do mesmo intervalo de tempo (t) descrito no ajuste de primeira ordem. A figura 19 a seguir mostra o comportamento cinético ajustado aos dois modelos.

Através do ajuste aos modelos de primeira e segunda ordem pode-se observar que o processo de adsorção da CPC na resina ficou mais bem ajustado ao modelo de segunda ordem, já que o $R^2=0,99$ do modelo de segunda ordem foi maior que o $R^2=0,94$ do modelo de primeira ordem. Este resultado vai de acordo com a suposição da existência de uma possível “reação” entre a CPC e a resina formando um complexo no sítio ativo da mesma. É possível inferir também que tanto a concentração da CPC quanto a concentração (quantidade) de resina são importantes para o processo de adsorção. A constante K encontrada para o processo de segunda ordem apresentou o valor de $3,011 \text{ L}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$. Barboza, Hokka e Maugeri (2002) estudaram o mecanismo de adsorção da CPC na resina XAD2, e apesar das características desta resina serem distintas das características da resina IRA410, os autores também trabalham com a possibilidade do mecanismo de adsorção se basear em uma reação entre a CPC e o sítio ativo da resina,

sendo que suas suposições são corroboradas por simulações que se aproximam com bastante fidelidade aos resultados experimentais.

Figura 19 – Ajuste da cinética de adsorção da CPC na resina IRA410 aos modelos de reação de primeira e segunda ordem.

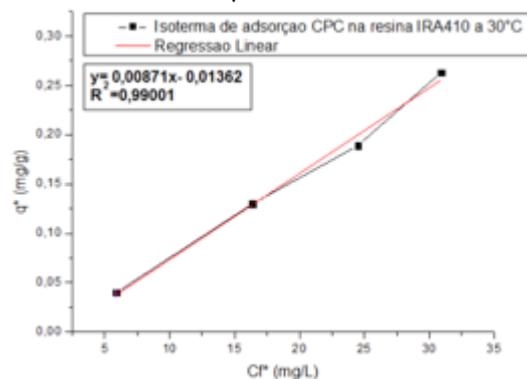


No caso do processo de adsorção da CPC na resina IRA410 pode-se propor então um mecanismo, baseado no mecanismo geral proposto por Barboza, Hokka e Maugeri (2002), também com base nos resultados obtidos nos ajustes cinéticos e levando-se em conta a troca iônica e a dependência das concentrações de CPC e de resina, como mostrado a seguir:



Outro ponto investigado no processo de adsorção da CPC na resina IRA410 foi o comportamento da isoterma de adsorção. As isotermas de adsorção da CPC já foram bastante exploradas na literatura, porém, todos os estudos encontrados abordam os processos realizados em resinas neutras como adsorvente. Nesta etapa obteve-se uma isoterma a 30°C do processo de adsorção da CPC na resina IRA410, onde q^* é a concentração de CPC na fase sólida (resina) e Cf^* a concentração de CPC na fase líquida. O resultado é observado na figura 20.

Figura 20 - Isoterma de adsorção da CPC na resina IRA410 a temperatura de 30°C.



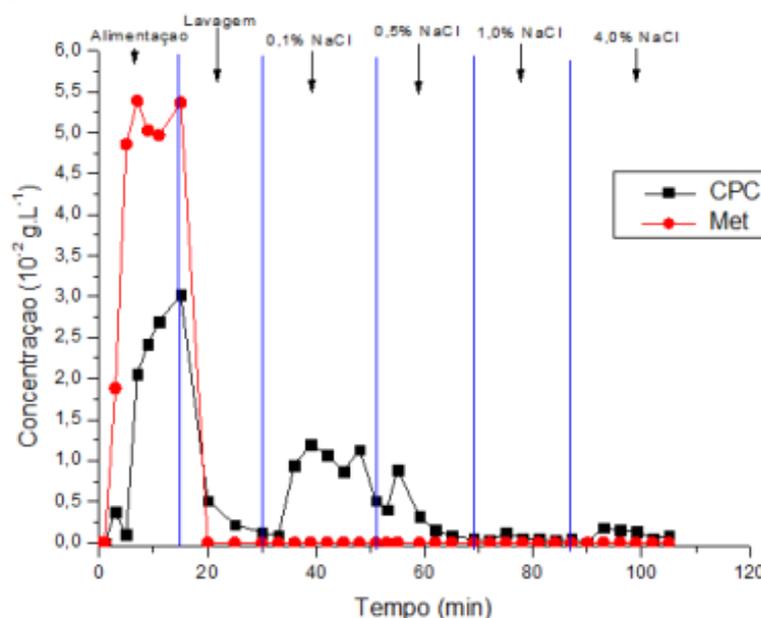
Inicialmente é possível observar que a isoterma tem uma tendência linear bastante acentuada, visto que o ajuste linear realizado levou a um $R^2 = 0,99$. Este resultado vai de encontro ao comportamento visto na literatura, já que vários autores destacam que ao se trabalhar em regiões de soluções diluídas o comportamento das isotermas tende a ser descrito pela lei de Henry que é uma relação linear (GEANKOPLIS, 2003; CHAUBAU, 1995). Neste caso as soluções de alimentação usadas foram de concentração 10,4, 30,2, 44,1 e 58,1 $mg.L^{-1}$, respectivamente, ou seja, soluções de baixa concentração. O valor de K encontrado para o modelo foi de $8,71.10^{-3} L.g^{-1}$, como não foram encontrados dados sobre o processo de adsorção em resinas trocadoras de íons o K encontrado não pode ser comparado com outros K de mesma natureza. Os valores descritos para outras resinas que adsorvem a CPC, como as neutras

XAD2, XAD4 e XAD16 têm isothermas ajustadas por outras relações como Langmuir e Freundlich, fato que dificulta a comparação com o resultado obtido para a IRA410. Como o R^2 para o ajuste foi igual a 0,99 pode-se concluir que o sistema operado a 30°C e pH de 3,6 na faixa de concentração estudada de 10,4 a 58,1 mg.L⁻¹ é bem representado pelo modelo linear. Em trabalhos futuros, as isothermas serão obtidas em diferentes valores de temperatura e também em diferentes valores de pH a fim de coletar mais dados acerca do processo de adsorção da CPC na resina IRA410 e também em termos de comparação entre os parâmetros.

O aminoácido metionina é considerado um potencial contaminante do caldo fermentado de onde a CPC é obtida, já que o mesmo é adicionado na alimentação do sistema e pode não ser totalmente consumido. A fim de verificar a possibilidade de separar a CPC do aminoácido metionina que é um potencial contaminante do caldo fermentado usando a resina IRA410 foi realizado um experimento simulando um caldo contendo a CPC e a metionina. A solução mimética foi preparada a uma concentração de 4,9.10⁻² g.L⁻¹ de CPC e também de metionina e o pH ajustado para 3,6. A solução foi injetada na coluna cromatográfica recheada com a resina IRA410, até que o sistema atingisse o ponto de ruptura. Essa alimentação foi planejada a partir dos dados obtidos anteriormente através das curvas de ruptura. A eluição foi realizada com soluções de cloreto de sódio nas concentrações de 0,1, 0,5, 1,0 e 4,0% m/V, em modo gradiente de degrau. A análise das frações coletadas foi realizada através de espectrofotometria no UV/Visível em comprimento de onda de 260 nm. A quantificação da metionina foi realizada através de cromatografia líquida de alta eficiência utilizando-se um Cromatógrafo com detector de arranjo de diodos (Waters 996 – PDA), uma coluna de fase reversa (μ-Bondapak C18 - 3,9 x 300 mm) e o equipamento foi operado dentro das seguintes condições: vazão de 2,5 mL.min⁻¹, temperatura de 28°C e os picos foram detectados em 220 nm. O cromatograma da separação entre CPC e a metionina é observado na figura 21. Observa-se no cromatograma que na região de alimentação do sistema o planejamento foi executado com sucesso, com a concentração de CPC ultrapassando um pouco o ponto de ruptura da coluna. Este planejamento faz com que a alimentação seja realizada de forma a evitar o desperdício da solução que alimenta o sistema, e que o mesmo seja usado com eficiência.

Na etapa de lavagem também é observado um resultado satisfatório, já que praticamente todo material não adsorvido é lavado da coluna visto que as concentrações das substâncias neste período são iguais a zero para metionina e igual a 0,09.10⁻² g.L⁻¹ para a CPC no momento anterior ao que a eluição é iniciada. A eluição foi iniciada com a solução de cloreto de sódio a 0,1%, durante o período que essa solução foi aplicada na coluna. Notou-se que a CPC começou a ser removida, atingindo um valor máximo de 1,2.10.10⁻² g.L⁻¹. Em seguida, a concentração da solução de eluição foi aumentada para 0,5%, neste período a CPC continuou sendo desorvida da coluna, apresentando um máximo de concentração de 0,89.10⁻² g.L⁻¹. A concentração da solução de eluição foi aumentada mais duas vezes, para 1,0 e 4,0%, respectivamente, porém não foram observados mais picos referentes à CPC durante o restante da corrida cromatográfica.

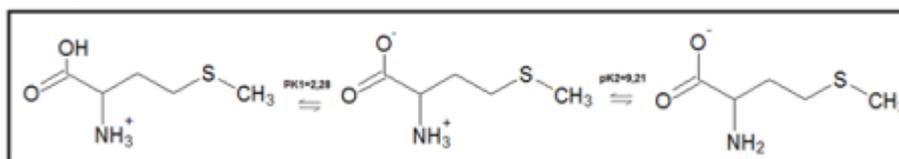
Figura 21- Cromatograma obtido da separação entre CPC e metionina.



O pico referente à CPC obtido mostrou-se largo sem formato definido e saindo durante um grande período de tempo. Esse comportamento se deve ao modo de eluição aplicado que começou com soluções de NaCl diluídas, fazendo com que a CPC fosse se desorvendo da resina aos poucos e de forma lenta, causando o alargamento do pico. Esse modo de eluição se mostrou menos eficiente do que o modo isocrático aplicado nos experimentos de ruptura. O alargamento do pico causa desvantagens econômicas já que o produto de interesse sairá da coluna menos concentrado e distribuído em maior volume de solvente.

Com relação à metionina observou-se que a mesma foi detectada apenas durante a alimentação do sistema e durante a etapa de lavagem. A metionina não foi detectada durante a etapa de eluição. Esse resultado indica que a mesma não foi adsorvida na resina. Este fato pode ser atribuído ao efeito do pH de 3,6 da solução. A metionina possui valores de pK iguais a 2,28 e 9,21 (NELSON, COX, 2000). Abaixo do valor de 2,28 a molécula deste aminoácido encontra-se totalmente protonada (carregada positivamente). Acima do valor de 9,21 a metionina encontra-se totalmente desprotonada (carregada negativamente). Por fim, em valores ao longo do intervalo de 2,28 e 9,21 a metionina encontra-se em um estado onde seu grupamento amino está protonado e o grupo ácido carboxílico desprotonado, desta forma, a molécula apresenta uma carga líquida igual zero. A figura 22, mostra os estados da molécula da metionina de acordo com os valores de pH. Este fato faz com que, provavelmente, a metionina comporte-se como uma molécula neutra não sendo adsorvida na resina IRA410, passando diretamente pela coluna.

Figura 22: Estados da molécula da metionina de acordo com seu pK.



CONCLUSÕES

A CPC interagiu bem com a resina IRA 410, sendo que os perfis de eluição obtidos não mostraram diferenças significativas, mostrando que a resina é capaz de adsorver a CPC em diferentes condições de concentração. A eluição do antibiótico realizada com a solução de cloreto de sódio a 4% m/v se mostrou eficiente, o pico obtido não é largo e elui em um tempo pequeno a partir da aplicação da solução de eluição, sendo assim, viável economicamente.

Os parâmetros da coluna, obtidos a partir das curvas de ruptura sem controle da vazão e temperatura, mostraram altos valores de eficiências com relação à remoção do soluto da solução. Porém, as curvas de ruptura não apresentaram o perfil desejável pela literatura, que gera o uso eficiente do leite. Obtendo-se as curvas de ruptura diminuindo o tamanho do leite e controlando a temperatura e vazão, houve um aumento da eficiência de uso do leite, obtiveram-se perfis semelhantes para as curvas em todas as vazões estudadas, porém, esses formatos ainda desviaram consideravelmente daqueles descritos na literatura.

Quanto à cinética pode-se concluir que foi o processo foi bem ajustado ao modelo de reação de segunda ordem e, além disso, foi possível atribuir um possível mecanismo de adsorção baseado em suposições descritas na literatura e nos resultados obtidos. A isoterma obtida a 30°C, pH 3,6 e faixa de concentração de 10,4 a 58,1 mg.L⁻¹ de CPC foi bem ajustada ao modelo linear. Este resultado é apoiado pelos resultados descritos na literatura, onde para soluções diluídas as isotermas tendem a seguir a lei de Henry que possui forma linear.

A estratégia usada para separar a CPC do contaminante metionina mostrou-se satisfatória, já que a metionina não interagiu com a resina e saiu da coluna logo que injetada, entretanto, a CPC foi adsorvida e, em seguida recuperada através da eluição com soluções de cloreto de sódio. Além disso, o modo de eluição isocrático mostrou-se mais eficiente já que faz com a CPC foi recuperada em menor tempo e em menos frações, gerando economia de tempo e também de consumíveis para o processo.

AGRADECIMENTOS

FAPEMIG, CNPq e CAPES

REFERÊNCIAS

- BARBOZA, M.; ALMEIDA, R. M. R. G.; HOKKA, C. O. Influence of the Temperature on the Kinetics of Adsorption and Desorption of Clavulanic Acid by Ionic Exchange. **Biochemical Engineering Journal**, v.14, p.19-26, 2003.
- BARBOZA, M.; HOKKA, C. O.; MAUGERI, F. Continuous Cephalosporin C Purification: A Dynamic Modeling and Parameter Validation. **Bioprocess Biosystems Engineering**, v.25, p.193-203, 2002.
- BASCH, J.; CHIANG, S-JD. Genetic Engineering Approach to Reduce Undesirable Products in Cephalosporin C Fermentation. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**. v.20, p.344-351, 1998.
- BEHMER, C. J.; DEMAİN, A. L. Further Studies on Carbon Catabolite Regulation of β -Lactam Antibiotic Synthesis in *Cephalosporium acremonium*. **Current Microbiology**. v.8, p.107-114, 1983.
- CALAM, C. T. Process Development in Antibiotics Fermentation. **Cambridge University Press**. Cap. 1, 1897.
- CHAUBAL, M. V. et al. Equilibria for the adsorption of antibiotics onto neutral polymeric sorbents: Experimental and modeling studies. **Biotechnology and Bioengineering**. v.47, p.215-226, 1995.
- COLLINS, C.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Fundamentos de Cromatografia**. Ed. UNICAMP. Campinas, 2006.
- CREN, E. C. et al. Breakthrough Curves for Oleic Acid Removal from Ethanolic Solutions Using Strong Anion Exchange Resin. **Separation and Purification Technology**. v.69, p.1-6, 2009.
- CUNHA, B. C. A. **Produção De Antibióticos**. Edgard Blucher, Ed. da Universidade de São Paulo, cap. 7, p.113-156, 1975.
- DEMAİN, A. L. Over Production of Microbial Metabolites and Enzymes Due Alteration of Regulation. **Advanced Biochemistry Engineer**. v.1, p.113-142, 1971.
- DEMAİN, A. L.; ELANDER, R.P. The β -lactam antibiotics: past, present, and future. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 75, p. 5-19, 1999.
- DEMAİN, A. L.; NEWKIRK, J. F.; HENDLIN, D. Effect of Methionine, Norleucine and Leucine Derivatives on Cephalosporin C Formation in Chemically Defined Media. **Journal of Bacteriology**. v.85, p.339-344, 1963.
- ELANDER, R. P. Production of Beta Lactams Antibiotics. **Applied Microbiology Technology**, v.61, p.385-392, 2003.
- FISHER, J. F.; MEROUEH, S. O; MOBASHERY, S. Bacterial Resistance to β -Lactam Antibiotics: Compelling Opportunism, Compelling Opportunity. **Chemical Reviews**. v.105, p.395-424. 2005.
- GEANKOPLIS, C.J. **Transport Process and Unit Operations**. Cap. 12, p.697-743, Prentice-Hall Inc., New Jersey, 2003.
- HAMAD, B. The antibiotics market. **Nature Reviews Drug Discovery**, v.9, p.675- 676, 2010.
- KEIM, C.; LADISCH, M. R. Bioseparation of Natural Products. **Progress in Biotechnology**, v.16, p. 15-20, 2000.
- MUNIZ, C. C. et al. Penicillin and Cephalosporin production: A historical perspective. **Revista Latinoamericana de Microbiologia**, v.49, p.88-98, 2007.

NAJAFPOUR, G. D. **Biochemical Engineer and Biotechnology**. 1ª Ed. Elsevier, Nova York. Cap.7, p.170-198, 2007.

OLIVEIRA, L. M. Purificação da Cefamicina C por Processo de Adsorção em Coluna de Leito Fixo. **Tese de Doutorado**. UFSCar: São Carlos, 2013.

PAGE, M. I.; LAWS, A. P. The chemical reactivity of the β -Lactams, β -Sulfans and β - Phospholactams. **Tetrahedron**, v.56, p. 5631-5638, 2000.

SACCO, D.; DELLACHERIER, D. Liquid Chromatography of Cephalosporin C and α -Amino Acid Mixtures on Polyfunctional Polystyrene Resins. **Journal of Chromatography**. v.211, p.79-86, 1981.

SILVA, A. S. The effect of invert sugar on the production of Cephalosporin C in a fed-batch bioreactor. **Brazilian journal of chemical engineering**, v.15, p.320-325, 1998.

SKATRUD, P. L. et al. Use of Recombinant DNA to Improve the Production of Cephalosporin C by *Cephalosporium acremonium*. **Biotechnology**. v.7, p.477-485, 1989.

STABLES, H. C.; BRIGGS, K. **Processing of cephalosporin C** US Patent, 4,205,165, 1 dez. 1978, 27 mai.1980.