



**MARCUS BRUNO SOARES FORTE**

**“ESTUDO DA ADSORÇÃO DE ÁCIDO CLAVULÂNICO EM  
HIDRÓXIDOS DUPLOS LAMELARES: CINÉTICA,  
EQUILÍBRIO E MODELAGEM MATEMÁTICA”**

*“CLAVULANIC ACID ADSORPTION STUDIES IN LAYERED DOUBLE  
HYDROXIDES: KINETICS, EQUILIBRIUM AND MATHEMATICAL MODELING”*

**CAMPINAS – SP**

**2013**





UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

**MARCUS BRUNO SOARES FORTE**

**“ESTUDO DA ADSORÇÃO DE ÁCIDO CLAVULÂNICO EM  
HIDRÓXIDOS DUPLOS LAMELARES: CINÉTICA, EQUILÍBRIO E  
MODELAGEM MATEMÁTICA”**

Orientador: Prof. Dr. Francisco Maugeri Filho

Co-orientadora: Profa. Dra. Maria Isabel Rodrigues

***“CLAVULANIC ACID ADSORPTION STUDIES IN LAYERED DOUBLE  
HYDROXIDES: KINETICS, EQUILIBRIUM AND MATHEMATICAL  
MODELING”***

Tese de Doutorado apresentada ao programa de Pós-Graduação  
em Engenharia de Alimentos da Faculdade de Engenharia de  
Alimentos da Universidade Estadual de Campinas para obtenção  
do título de Doutor em Engenharia de Alimentos.

*Doctorate Thesis presented to the Food Engineering Postgraduation  
Programme of the Faculty of Food Engineering of the University of  
Campinas to obtain the Ph.D. grade in Food Engineering.*

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE  
DEFENDIDA PELO ALUNO MARCUS BRUNO SOARES FORTE E  
ORIENTADA PELO PROF. DR. FRANCISCO MAUGERI FILHO

Assinatura do Orientador

---

**CAMPINAS – SP**

**2013**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR  
MÁRCIA REGINA GARBELINI SEVILLANO – CRB8/3647- BIBLIOTECA DA  
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS – UNICAMP

F776e Forte, Marcus Bruno Soares.  
Estudo da adsorção de ácido clavulânico em hidróxidos duplos lamelares: cinética, equilíbrio e modelagem matemática / Marcus Bruno Soares Forte. – Campinas, SP : [s.n.], 2013.

Orientador: Francisco Maugeri Filho.  
Coorientador: Maria Isabel Rodrigues.  
Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Ácido clavulânico. 2. Leito fixo. 3. Hidróxido duplo lamelar. 4. Microencapsulação. I. Maugeri Filho, Francisco, 1952- II. Rodrigues, Maria Isabel, 1957- III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em inglês:** Clavulanic acid adsorption studies in layered double hydroxides: kinetics, equilibrium and mathematical modeling

**Palavras-chave em inglês:**

Clavulanic acid

Fixed bed

Layered double hydroxide

Microencapsulation

**Área de concentração:** Engenharia de Alimentos

**Titulação:** Doutor em Engenharia de Alimentos

**Banca examinadora:**

Francisco Maugeri Filho [Orientador]

Daniel Ibraim Pires Atala

Eliana Setsuko Kamimura

Marcio Antonio Mazutti

Rubens Maciel Filho

**Data da defesa:** 27-02-2013

**Programa de Pós Graduação:** Engenharia de Alimentos

## **BANCA EXAMINADORA**

---

**Prof. Dr. Francisco Maugeri Filho (FEA/UNICAMP) – Orientador**

---

**Dr. Daniel Ibraim Pires Atala (BRITISH PETROLEUM) – Membro Titular**

---

**Profa. Dra. Eliana Setsuko Kamimura (FZEA/USP) – Membro Titular**

---

**Prof. Dr. Marcio Antonio Mazutti (DEQ/UFSM) – Membro Titular**

---

**Prof. Dr. Rubens Maciel Filho (FEQ/UNICAMP) – Membro Titular**

---

**Prof. Dr. Fernando Antonio Cabral (FEA/UNICAMP) – Membro Suplente**

---

**Prof. Dr. Marlei Barboza Pasotto (DEQ/ICTE/UFTM) – Membro Suplente**

---

**Profa. Dra. Telma Teixeira Franco (FEQ/UNICAMP) – Membro Suplente**



*“Aprender é a única coisa de que a mente nunca se cansa, nunca tem medo e nunca se arrepende.”*

*Leonardo da Vinci.*



*Dedico esta Tese de Doutorado  
a minha mãe, Guiomar Soares Maia Forte (in memoriam),  
a minha avó e mãe, Antônia Maria de Lima  
e a minha sobrinha, Laura Forte.*



## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente, eu gostaria de agradecer a DEUS! Pela força divina que alimenta minha alma!

Aos meus queridos orientadores, Francisco Maugeri Filho e Maria Isabel Rodrigues. Sinceramente, é difícil estabelecer um critério para listar os motivos de agradecimentos a vocês. Sem dúvida alguma, grande parcela de meu crescimento profissional e pessoal deve-se a vocês. Muito obrigado pela presença, cumplicidade, transmissão de conhecimento, paciência, compreensão e principalmente por todas as oportunidades que vocês me disponibilizaram de aprender e ensinar, não só no campo profissional. Podem ter certeza que irei passar tudo isso para frente com responsabilidade. Sou muito orgulhoso de ter trabalhado e convivido com vocês durante esses anos. Muito obrigado de coração!

Aos componentes da Banca Examinadora, Professores Eliana Kamimura, Márcio Mazutti, Rubens Maciel Filho, Daniel Atala, Fernando Cabral, Marlei Barboza e Telma Franco pela contribuição e auxílio. Suas contribuições foram indispensáveis na qualidade dessa Tese. Em especial aos Professores Marlei, presente em todas as minhas qualificações/defesa de Mestrado e Doutorado e que vem me ajudando desde o início do Mestrado, e Márcio pela amizade e ajuda incondicional ao longo do trabalho.

Aos meus colegas de trabalho e amigos do Laboratório de Engenharia de Bioprocessos (LEB): Abraão, Andrea, Elizama, Eliane (Eli), Ana Paula, Felipe, Fernanda, Geraldo, Mónica, Olga, Raquel, Remi, Márcio, Cristiane (Cris), Susan, Suzana, Daniele (Dani), Mariano, Marina, Bárbara, Lais, Natália, Phelipe, Ricardo, Karla, Gislaine (Gi), Priscila... por todos os bons momentos de discussão e descontração, pelos cafés e debates onde sempre tivemos a oportunidade e

liberdade de nos ajudar, proporcionando um crescimento mútuo. Nós sabemos como nosso laboratório sempre foi um ambiente harmonioso de trabalho e companheirismo. À aluna de iniciação científica, Élen Elias, pela parceria e oportunidades compartilhadas. Especialmente, a Rosana Goldbeck (Rô), minha amiga sempre presente desde a minha chegada em Campinas e no laboratório, que me acompanhou em todos os momentos incluindo todas as viagens em congressos no Brasil e no exterior e o estágio sanduíche na França, muito obrigado pela amizade e parceria!

A Fátima Costa, nossa querida Fifa, sempre presente e disponível, chegando de mansinho e ajudando sem que se perceba. Muito obrigado por estar presente e compartilhar conosco nossas vitórias e dificuldades. Você é um exemplo de profissional e ser humano. Saiba que você está presente não só na minha mas em todas as Teses e Dissertações desse laboratório.

A FAPESP e CAPES pelo suporte financeiro.

Aos professores e funcionários da Faculdade de Engenharia de Alimentos (FEA) da UNICAMP, em especial, do Departamento de Engenharia de Alimentos (DEA) e Secretaria de Pós-Graduação. Agradeço de forma especial aos secretários do DEA (Frederico, Reinaldo e Mauro) e da Pós-Graduação (Cosme e Marcos) pela disposição e competência. Sem vocês esse trabalho não poderia ter sido realizado.

A todos os meus colegas e amigos do DEA, pelos momentos de estudos, brincadeiras, cafezinhos, futebol e tudo o mais. A todos meus amigos da FEA e da UNICAMP. Aos amigos de Campinas fora da universidade, em especial meu grande amigo Gilberto (Giba), pelas conversas e bons momentos.

Ao meu grande amigo, César Augusto! Muito obrigado por tudo, pelos conselhos, conversas, cervejas, enfim, pela presença e compreensão incondicionais dentro e fora da universidade!

Aos professores, pós-graduandos e funcionários do Laboratório de Engenharia Bioquímica/UFSCar, pela parceria, atenção e compreensão, especialmente ao Prof. Hokka, Prof. Marlei, Álvaro e Clóvis por todas as dicas.

Aos Professores Mansur (UFSCar), Paulo Moran (IQ/UNICAMP), Heloíse Pastore (IQ/UNICAMP), Carlos Grosso (FEA/UNICAMP), Rosiane Cunha (FEA/UNICAMP), Meuris Gurgel (FEQ/UNICAMP) pela disponibilidade de equipamentos. Ao Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (CNPEM) pelo suporte em análises. Ao Prof. Marcio Schwaab pela partilha de conhecimentos. À pesquisadora Ana Carla Sato e doutoranda Kátia Kuhn pela amizade e ajuda em análises e Ambrósio Neto pela ajuda em análises.

Ao Prof. Sílvio Rossi, pelo exemplo e orientação ao longo de minha carreira universitária. Ao Prof. Bora, pelo apoio e compreensão em minha Iniciação Científica;

A todos os professores, funcionários e colegas do Colégio Normal Francisca Mendes, Colégio Técnico Dom Vital e Universidade Federal da Paraíba, por todo o aprendizado ao longo dessa caminhada.

A toda a equipe do *Laboratoire des Matériaux Inorganiques - Université Blaise-Pascal*, em Clermont-Ferrand, França, em especial aos Professores Christine Taviot-Guého e Fabrice Leroux pela parceria durante meu período de estágio sanduíche, a qual rendeu um crescimento profissional muito importante em minha carreira. Aos amigos Souad Touati, Mohammed Hennous, Claire Gaillard, Rachid Aitakbour,

Thomas Stimpfling, Nathalia Pradal, Petra Urbanová, Nadia Touisni, Xavier Courtial pela amizade na França, em especial a Martha Merchan pelo apoio, presença e amizade!

A todos os meus companheiros de morada durante esses anos em Campinas: Romildo, César, Hector, Gérman, Rodrigo, Felipe, Marcel, Thiago, Leonardo (Bola), Leonardo Belchior, Lucas e Alexandre. Vocês foram muito especiais em vários momentos!!! Peço obrigado por tudo e principalmente pela paciência e apoio em meus momentos de estresse, e pelos churrascos, claro!!!

À minha mãe, Guiomar, pela presença espiritual constante, sem a qual tenho certeza que nada disso seria possível. Você se foi muito cedo, mas deixou um exemplo de mãe, filha, irmã, amiga, professora e companheira invejável, eu tenho um orgulho muito grande de ser fruto seu... existe em mim uma semente que tento semear todos os dias de minha vida... A meu pai, Sebastião, o sr está sempre presente em meus pensamentos e atitudes, me servindo de exemplo e referencial de ética, caráter, dedicação, honestidade, enfim, de homem. Como costume dizer, as palavras são insuficientes perante nosso sentimento. Muito obrigado por tudo! A meus irmãos, Delano e Márlon, pelo apoio incondicional em diferentes etapas de minha vida, como já falei e repito, vocês são o meu porto seguro... A meus irmãos, Rodolfo e Gustavo, pela confiança e apoio. A meus sobrinhos, Gabriel e Laura, pela simples existência, a qual me reanima a cada momento de tristeza!

A minha família paterna (Forte), amo todos vocês. Um exemplo típico da versão simples e verdadeira do amor representado por meus avós, Seu Bento Forte e Dona Antônia, figuras marcantes em minha vida, meus pais de criação que me deram todo o carinho e educação. Gostaria de agradecer em especial a Tia Joana e Messias pelos cuidados com minha avó. A minha família

materna (Soares Maia), pela alegria, união, cumplicidade e também exemplo de amor que sempre foi marcante apesar da distância.

A minha namorada, Daniela Freitas, por todo o amor, por toda cumplicidade que emana de suas atitudes, pela sua presença incondicional em meus momentos de dificuldade e de alegria! Eu sinto sua bondade e compaixão e é por isso que quero, cada vez mais, que nosso sentimento seja alimentado com a paz e o amor de Cristo. Muito obrigado pelo apoio em meus momentos de fraqueza e pela paciência sobretudo com minha ausência no final da Tese, sempre entendendo e me ajudando.

A Cidora, Thallyssa, Thallytta e meus compadres, Josimá Júnior e Silvaneide, pelo carinho, amizade e diversão em todos os momentos. Aos meus compadres, Jasson e Iuçara, pela imensa amizade e parceria. A todos os meus queridos e eternos amigos de Catolé do Rocha e João Pessoa-PB, belos anos vividos. A presença de vocês é indispensável para mim.

A todos que contribuíram para realização desse trabalho.



## SUMÁRIO

<b>CAPÍTULO 1: Apresentação do trabalho e revisão bibliográfica.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 APRESENTAÇÃO .....</b>	<b>3</b>
<b>1.2 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>4</b>
<b>1.3 OBJETIVOS .....</b>	<b>7</b>
1.3.1 OBJETIVO GERAL.....	7
1.3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	7
<b>1.4 ESTRATÉGIAS TOMADAS NO TRABALHO .....</b>	<b>9</b>
<b>1.5 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>10</b>
1.5.1 BIOPROCESSOS E <i>DOWNSTREAM</i> .....	10
1.5.2 ANTIBIÓTICOS $\beta$ -LACTÂMICOS E $\beta$ -LACTAMASES .....	12
1.5.3 ÁCIDO CLAVULÂNICO (CA).....	15
1.5.4 HIDRÓXIDOS DUPLOS LAMELARES (LDH) .....	29
1.5.5 ADSORÇÃO.....	36
1.5.6 REATORES USADOS EM PROCESSOS ADSORTIVOS .....	51
<b>1.6 LITERATURA CITADA.....</b>	<b>56</b>
<b>CAPÍTULO 2: Evaluation of clavulanic acid adsorption in MgAl-layered double hydroxides: kinetic, equilibrium and thermodynamic studies.....</b>	<b>73</b>
<b>2.1 INTRODUCTION .....</b>	<b>78</b>
<b>2.2 METHODOLOGY .....</b>	<b>80</b>
2.2.1 CLAVULANIC ACID ANALYSIS .....	80
2.2.2 ESTIMATION OF THE HYDROLYSIS COEFFICIENT USING FACTORIAL DESIGN .....	80

2.2.3 HYDROTALCITES .....	81
2.2.4 CHARACTERIZATION OF ADSORBENTS .....	82
2.2.5 BATCH ADSORPTION .....	82
2.2.6 EQUILIBRIUM ISOTHERMS .....	83
<b>2.3 RESULTS AND DISCUSSION .....</b>	<b>83</b>
2.3.1 CLAVULANIC ACID HYDROLYSIS .....	83
2.3.2 ADSORPTION KINETICS .....	87
2.3.3 CHARACTERIZATION .....	94
2.3.4 EQUILIBRIUM .....	96
2.3.5 THERMODYNAMIC MECHANISM .....	97
<b>2.4 CONCLUDING REMARKS .....</b>	<b>100</b>
<b>2.5 ACKNOWLEDGEMENTS .....</b>	<b>100</b>
<b>2.6 REFERENCES .....</b>	<b>101</b>

<b>CAPÍTULO 3: Determination of equilibrium and mass-transfer parameters in a batch adsorption system: mathematical modeling of clavulanic acid adsorption in hydrotalcites.....</b>	<b>105</b>
<b>3.1 INTRODUCTION .....</b>	<b>110</b>
<b>3.2 METHODOLOGY .....</b>	<b>112</b>
3.2.1 ADSORBENTS .....	112
3.2.2 EXPERIMENTAL DATA .....	112
3.2.3 CLAVULANIC ACID ANALYSIS .....	112
3.2.4 MATHEMATICAL MODELING .....	113
3.2.5 PARAMETRIC SENSITIVITY .....	117
<b>3.3 RESULTS AND DISCUSSION .....</b>	<b>118</b>

---

3.3.1 ADSORPTION KINETICS AND MODEL PARAMETERS .....	118
3.3.2 SENSITIVITY ANALYSIS.....	122
<b>3.4 CONCLUSIONS.....</b>	<b>127</b>
<b>3.5 ACKNOWLEDGEMENTS.....</b>	<b>127</b>
<b>3.6 REFERENCES .....</b>	<b>127</b>
<b>CAPÍTULO 4: Intercalation and adsorption of clavulanic acid in layered double hydroxides.....</b>	<b>131</b>
<b>4.1 INTRODUCTION .....</b>	<b>135</b>
<b>4.2 METHODOLOGY .....</b>	<b>137</b>
4.2.1 MATERIALS .....	137
4.2.2 SYNTHESSES OF LDH ADSORBENTS AND Zn <sub>2</sub> Cr-CA HYBRID ASSEMBLIES.....	138
4.2.3 CHARACTERIZATION OF ADSORBENTS AND HYBRID ASSEMBLIES.....	139
4.2.4 EQUILIBRIUM ISOTHERMS FOR CLAVULANIC ACID ADSORPTION .....	140
4.2.5 CLAVULANIC ACID CONCENTRATION DETERMINATION .....	141
<b>4.3 RESULTS AND DISCUSSION.....</b>	<b>142</b>
4.3.1 PREPARATION AND CHARACTERIZATION OF LDH ADSORBENTS AND Zn <sub>2</sub> Cr-CA HYBRID ASSEMBLIES.....	142
4.3.2 CLAVULANIC ACID ADSORPTION ON LAYERED DOUBLE HYDROXIDES .....	150
<b>4.4 CONCLUSIONS.....</b>	<b>154</b>
<b>4.5 ACKNOWLEDGEMENTS .....</b>	<b>155</b>
<b>4.6 REFERENCES .....</b>	<b>155</b>

<b>CAPÍTULO 5: Desenvolvimento e caracterização de micropartículas de alginato com hidróxidos duplos lamelares encapsulados e sua aplicação como adsorventes em coluna de leito fixo para separação de ácido clavulânico .....</b>	<b>159</b>
<b>5.1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>163</b>
<b>5.2 METODOLOGIA .....</b>	<b>165</b>
5.2.1 MATERIAIS .....	165
5.2.2 SÍNTESE DE HIDRÓXIDOS DUPLOS LAMELARES .....	166
5.2.3 CARACTERIZAÇÃO DOS HIDRÓXIDOS DUPLOS LAMELARES ...	167
5.2.4 MICROENCAPSULAÇÃO .....	167
5.2.5 PROPRIEDADES DAS MICROCÁPSULAS.....	169
5.2.6 CARACTERIZAÇÃO DO LEITO DE PARTÍCULAS .....	170
5.2.7 ENSAIOS DE ADSORÇÃO EM COLUNA DE LEITO FIXO.....	171
5.2.8 ANÁLISE DE ÁCIDO CLAVULÂNICO E AMINOÁCIDOS .....	173
<b>5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>174</b>
5.3.1 PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS ADSORVENTES LDH.....	174
5.3.2 CARACTERIZAÇÃO DAS PARTÍCULAS DE LDH <sub>ME</sub> .....	175
5.3.3 POROSIDADE DO LEITO .....	178
5.3.4 APLICAÇÃO DAS MICROPARTÍCULAS LDH <sub>ME</sub> NA SEPARAÇÃO DE CA....	179
<b>5.4 CONCLUSÕES .....</b>	<b>183</b>
<b>5.5 AGRADECIMENTOS.....</b>	<b>184</b>
<b>5.6 REFERÊNCIAS .....</b>	<b>184</b>

---

<b>CAPÍTULO 6: Modelagem matemática da adsorção de ácido clavulânico através de curvas de ruptura em hidróxidos duplos lamelares microencapsulados em géis de alginato .....</b>	<b>189</b>
<b>6.1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>193</b>
<b>6.2 METODOLOGIA .....</b>	<b>196</b>
6.2.1 ADSORVENTES .....	196
6.2.2 ENSAIOS EXPERIMENTAIS .....	197
6.2.3 ANÁLISE DE ÁCIDO CLAVULÂNICO .....	197
6.2.4 AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO DO PROCESSO – DCCR EXPERIMENTAL .....	197
6.2.5 MODELAGEM MATEMÁTICA .....	199
6.2.6 APLICAÇÃO DO MODELO .....	203
<b>6.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>204</b>
6.3.1 CURVAS DE RUPTURA EXPERIMENTAIS .....	204
6.3.2 ESTIMAÇÃO DOS PARÂMETROS E VALIDAÇÃO DO MODELO... ..	211
6.3.3 SIMULAÇÕES E OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO .....	213
<b>6.4 CONCLUSÕES .....</b>	<b>216</b>
<b>6.5 AGRADECIMENTOS .....</b>	<b>217</b>
<b>6.6 REFERÊNCIAS .....</b>	<b>217</b>
<b>CAPÍTULO 7: Conclusões gerais e sugestões para trabalhos futuros .....</b>	<b>221</b>
<b>7.1 CONCLUSÕES GERAIS .....</b>	<b>223</b>
<b>7.2 SUGESTÕES .....</b>	<b>225</b>



## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO 1

**Tabela 1.1:** Composição de algumas argilas naturais com sistema cristalino e grupo espacial.

### CAPÍTULO 2

**Table 2.1:** Data of the CCRD for CA hydrolysis, with results for the hydrolysis constant ( $k_h$ ).

**Table 2.2:** Analysis of variance (ANOVA) of the CA hydrolysis model.

**Table 2.3:** Equilibrium and thermodynamic parameters of CA adsorption in HT70c hydrotalcite.

### CAPÍTULO 3

**Table 3.1:** Factor levels (coded and real values) of the CCRD for the equilibrium and mass-transfer parameters of CA adsorption in HT63c hydrotalcite.

**Table 3.2:** Optimized equilibrium and mass-transfer parameters for CA adsorption in the different types of hydrotalcites.

**Table 3.3:** Data for the CCRD with coded input parameters values and response (output variable) equilibrium time ( $t^*$ ) for mass-transfer parameters of CA adsorption in HT63c hydrotalcite.

**Table 3.4:** ANOVA of CCRD models for equilibrium and mass-transfer parameters: explained variations ( $R^2$ ), calculated F ( $F_{calc}$ ) and the listed values for 5 % significance ( $F_{list}$ ).

### CAPÍTULO 4

**Table 4.1:** Synthesis conditions for LDH adsorbents and LDH hybrid assemblies from source 1 (HBD1) and source 2 (HBD2) by the coprecipitation method.

**Table 4.2:** Equilibrium and thermodynamic parameters of CA adsorption on  $Zn_2Cr-NO_3$  LDH.

## CAPÍTULO 5

**Tabela 5.1:** Condições experimentais dos ensaios em coluna de leito fixo de LDH<sub>ME</sub>.  
T = 25°C; L = 5,0 cm; V<sub>i</sub> = 0,5 mL.

**Tabela 5.2:** Caracterização das microcápsulas LDH<sub>ME</sub> quanto ao diâmetro médio das partículas ( $d_p$ ), diâmetro médio dos poros ( $d_{pore}$ ), densidades aparente ( $\rho_{bulk}$ ) e real ( $\rho_p$ ) e porosidade da partícula ( $\epsilon_p$ ).

**Tabela 5.3:** Parâmetros operacionais e resultados dos primeiros momentos dos sistemas com LDH<sub>ME</sub> ( $\mu^p$ ), sem LDH<sub>ME</sub> ( $\mu^u$ ), e do leito ( $\mu = \mu^p - \mu^u$ ).  
d = 1,0 cm; L = 1,4 cm.

**Tabela 5.4:** Fatores de purificação (PF) do CA referentes à TYR e PRO dos pontos mais significativos do perfil cromatográfico em leito de LDH<sub>ME</sub>.

## CAPÍTULO 6

**Tabela 6.1:** Propriedades das partículas de LDH<sub>ME</sub>: diâmetro médio das partículas ( $d_p$ ), diâmetro médio dos poros ( $d_{pore}$ ), densidades aparente ( $\rho_{bulk}$ ) e real ( $\rho_p$ ), porosidade da partícula ( $\epsilon_p$ ) e porosidade do leito ( $\epsilon_B$ ).

**Tabela 6.2:** Níveis codificados dos fatores estudados no DCCR experimental para as curvas de ruptura de CA em coluna de leito fixo de LDH<sub>ME</sub> e seus valores reais.

**Tabela 6.3:** Níveis codificados dos fatores estudados no DCCR simulado e os respectivos valores usados nas simulações com os parâmetros do modelo ajustados.

**Tabela 6.4:** Dados do delineamento (DCCR) experimental para as curvas de ruptura de ácido clavulânico em leito fixo de LDH<sub>ME</sub>: tempo de ruptura ( $t_b$ ), tempo de exaustão ( $t_e$ ), eficiência de recuperação ( $\phi_{rec}$ ), eficiência de utilização da coluna ( $\phi_{col}$ ) e produtividade (P) em função da vazão (Q) e comprimento do leito (L).

**Tabela 6.5:** ANOVA dos modelos empíricos para tempo de ruptura ( $t_b$ ), tempo de exaustão ( $t_e$ ) e produtividade (P): coeficientes de determinação ( $R^2$ ), fatores F calculados ( $F_{calc}$ ) e tabelado para 5 % de significância ( $F_{list}$ ).

**Tabela 6.6:** Parâmetros de transporte, cinéticos e de equilíbrio estimados e otimizados pelo algoritmo PSO para o modelo proposto para a adsorção de ácido clavulânico.

**Tabela 6.7:** Dados do delineamento (DCCR) simulado para as curvas de ruptura de ácido clavulânico em leito fixo de LDH<sub>ME</sub>: tempo de ruptura ( $t_b$ ), tempo de exaustão ( $t_e$ ), eficiência de recuperação ( $\phi_{rec}$ ), eficiência de utilização da coluna ( $\phi_{col}$ ) e produtividade (P) em função da vazão de alimentação (Q) e comprimento do leito (L).



## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO 1

**Figura 1.1:** Inibidores de  $\beta$ -lactamases atualmente mais frequentes. Fonte: Hamed et al. (2013).

**Figura 1.2:** Estrutura química do ácido clavulânico (CA).

**Figura 1.3:** Biossíntese do ácido clavulânico (CA). Fonte: Oliveira et al. (2009).

**Figura 1.4:** Dissociação da molécula do ácido clavulânico em clavulanato ( $CA^{-1}$ ).  
Fonte: Morão et al. (2008).

**Figura 1.5:** Efeito do pH na constante de hidrólise do ácido clavulânico (CA) a 20°C e força iônica de 0,5. Fonte: Bersanetti et al. (2000).

**Figura 1.6:** Esquema tridimensional da estrutura das argilas aniônicas.  
Fonte: Crepaldi e Valim (1998).

**Figura 1.7:** Modelo estrutural de interação de um pesticida com hidróxidos duplos lamelares (LDH). Fonte: Inacio et al. (2001).

**Figura 1.8:** Modelo proposto de orientação do ácido orgânico diclofenaco no espaço interlamelar do hidróxido duplo lamelar (LDH). Fonte: Dupin et al. (2004).

**Figura 1.9:** Adsorção por troca iônica. Fonte: Pessoa Jr. (2005).

**Figura 1.10:** Adsorção por afinidade. Fonte: Kamimura e Maugeri Filho (2005).

**Figura 1.11:** Adsorção por exclusão de tamanho molecular. Fonte: Moraes e Rosa (2005).

**Figura 1.12:** Adsorção por hidrofobicidade. Fonte: Maugeri Filho e Mendieta-Taboada (2005).

**Figura 1.13:** Transporte de massa do adsorbato do meio líquido para o interior da partícula do adsorvente: (a) efeito de difusão intraparticular; (b) perfis de concentração ao longo do sistema. Fonte: Scmal (2010).

**Figura 1.14:** Reatores do tipo tubular, batelada e tanque. Fonte: Scmal (2010).

**Figura 1.15:** Exemplos de respostas em colunas adsorptivas de leito fixo: (a) pulso cromatográfico e (b) curvas de ruptura. Fonte: Burkert (2003); Guillemot et al. (2008).

## CAPÍTULO 2

**Figure 2.1:**  $\ln(k_h)$  as a function of the temperature and pH.

**Figure 2.2:**  $\ln(k_h)$  as a function of the temperature and buffer concentration.

**Figure 2.3:** Adsorption kinetics for CA in (a) uncalcined and (b) calcined hydrotalcites. Solvent: phosphate buffer.  $T = 30^\circ\text{C}$ .  $C_0 = 200 \text{ mg/L}$ .  $\varepsilon_{st} = 30.0 \text{ mg/mL}$ .

**Figure 2.4:** Adsorption kinetics for CA in (a) uncalcined HT63 and (b) calcined hydrotalcites. Solvent: distilled water.  $T = 30^\circ\text{C}$ .  $C_0 = 200 \text{ mg/L}$ .  $\varepsilon_{st} = 30.0 \text{ mg/mL}$ .

**Figure 2.5:** Adsorption kinetics for CA in (a) HT30c, (b) HT63c and (c) HT70c. Solvent: distilled water.  $T = 30^\circ\text{C}$ .  $C_0 = 3,000 \text{ mg/L}$ .  $\varepsilon_{st} = 15.0 \text{ mg/mL}$ . (▪)  $C/C_0$  (o) pH.

**Figure 2.6:** SEM image of the HT70c hydrotalcite.

**Figure 2.7:** Powder XRD patterns of the HT70 and HT70c hydrotalcites.

**Figure 2.8:** FTIR spectrum of the HT70c hydrotalcite.

**Figure 2.9:** Linear regression for the experimental data of CA adsorption isotherms on the HT70c hydrotalcite according to the linear model at different temperatures.

## CAPÍTULO 3

**Figure 3.1:** Chemical structure of clavulanic acid.

**Figure 3.2:** Adsorption of clavulanic acid (CA) in the different hydrotalcites: (a) HT30c; (b) HT63c; (c) HT70c. Symbols represent experimental data and the curves are the model predictions with the optimized parameters.

**Figure 3.3:** Profile curves for equilibrium time ( $t^*$ ) of clavulanic acid adsorption as a function of equilibrium and mass-transfer parameters: adsorption constant ( $k_{lin}$ ), film coefficient ( $k_f$ ) and effective diffusivity ( $D_{ef}$ ).

## CAPÍTULO 4

**Figure 4.1:** Chemical structure and dimensional analysis of (a) clavulanic acid (CA) and (b) amoxicillin (AM).

**Figure 4.2:** (a) Powder XRD diffractograms of  $Zn_2Cr$ -Cl LDH the  $Zn_2Cr$  hybrid assemblies (HBD1, HBD2 and  $Zn_2Cr$ -AM) performed; (b) low theta ( $1 - 10^\circ$ ) measurements; (c)  $Zn_2Cr$ - $NO_3$  LDH and the adsorbents at the end of the adsorption experiments.

**Figure 4.3:** FTIR spectra of (a)  $Zn_2Cr$ -Cl and HBD1 hybrids, (b) CA and AM molecules, (c) comparison among CA hybrids HBD1, HBD2 and  $Zn_2Cr$ -AM, (d) gives a detailed indexation of IR bands for HBD2 hybrids in the range  $400-2000\text{ cm}^{-1}$ , (e) comparison among LDH adsorbent, CA hybrid and the adsorbents at the end of the adsorption experiments.

**Figure 4.4:** Thermo-gravimetric and heat flow curves for (a)  $Zn_2Cr$ -Cl, (b) CA (Clavulanate:Avicel) and (c) HBD2b hybrid .

**Figure 4.5:**  $^{13}C$  CPMAS NMR measurements for Clavulin<sup>®</sup> and Clavulanate:Avicel (1:1).

**Figure 4.6:**  $^{13}C$  CPMAS NMR measurements for Clavulanate:Avicel (1:1) and the corresponding  $Zn_2Cr$ - hybrid assemblies (HBD2a and HBD2b).

**Figure 4.7:** Adsorption isotherms of CA on (a)  $Zn_2Cr$ - $NO_3$ , (b)  $Zn_2Al$ - $NO_3$  and (c)  $Mg_2Al$ - $NO_3$ .

**Figure 4.8:** Non-linear regression (Freundlich model) of the experimental data for the CA adsorption isotherms on  $Zn_2Cr$ - $NO_3$  and  $Mg_4Al$ - $CO_3$  (Forte et al., 2012) at different temperatures.

## CAPÍTULO 5

**Figura 5.1:** Estrutura química do ácido clavulânico.

**Figura 5.2:** Montagem experimental para síntese de hidróxidos duplos lamelares (LDH) pelo método de coprecipitação: (a) pequena escala. Fonte: Troutier-Thuilliez et al. (2009); (b) escala piloto.

**Figura 5.3:** Preparo das microcápsulas LDH<sub>ME</sub>: aparato experimental da microencapsulação dos adsorventes em alginato por gelificação iônica.

**Figura 5.4:** Sistema FPLC com coluna empacotada com partículas de LDH<sub>ME</sub>. (A) soluções; (B) sistema de bombas; (C) injeção (*loop*); (D) coluna encamisada; (E) detector UV; (F) coletor de frações; (G) banho termostatizado.

**Figura 5.5:** Caracterização dos hidróxidos duplos lamelares produzidos: (a) difratograma PXRD; (b) espectroscopia na região do infravermelho FTIR.

**Figura 5.6:** Imagens das micropartículas formadas: (a) alginato (ALG); (b e c) hidróxidos duplos lamelares microencapsulados em alginato (LDH<sub>ME</sub>).

**Figura 5.7:** Caracterização das micropartículas LDH<sub>ME</sub>: (a) distribuição do tamanho de partículas; (b) distribuição porosimétrica (incremento de intrusão em função do diâmetro de poros).

**Figura 5.8:** Perfis de eluição do traçador nas diferentes vazões (a) 0,50 e 1,00 mL/min; (b) 1,25 e 1,50 mL/min; (c) 1,75 e 2,00 mL/min; (d) ajuste do primeiro momento do leito para diferentes velocidades superficiais ( $R^2 = 0,92$ ).

**Figura 5.9:** Perfis cromatográficos dos ensaios usando leito fixo de LDH<sub>ME</sub>: (a) microgéis de ALG (A14); (b) micropartículas LDH<sub>ME</sub> (A11); (c) separação de CA e aminoácidos (TYR e PRO) com micropartículas LDH<sub>ME</sub> (A22).

## CAPÍTULO 6

**Figura 6.1:** Curvas de ruptura do delineamento (DCCR) experimental: os pontos correspondem aos dados experimentais e as linhas contínuas aos calculados pelo modelo matemático ajustado pelo algoritmo (PSO).

**Figure 6.2:** Diagramas de Pareto para as respostas avaliadas no processo de adsorção de ácido clavulânico: (a) tempo de ruptura,  $t_b$ ; (b) tempo de exaustão,  $t_e$ ; (c) produtividade,  $P$ .

**Figura 6.3:** Superfícies de resposta e curvas de contorno para as respostas avaliadas no processo de adsorção de ácido clavulânico: (a) tempo de ruptura,  $t_b$ ; (b) tempo de exaustão,  $t_e$ ; (c) produtividade,  $P$ .

**Figura 6.4:** Curvas de ruptura simuladas usando o modelo proposto com os parâmetros estimados para a adsorção de ácido clavulânico.

## RESUMO GERAL

A proposta desta tese foi o estudo da adsorção do ácido clavulânico (CA) em hidróxidos duplos lamelares (LDH) e o uso desses adsorventes em colunas de leito fixo na separação entre o CA e aminoácidos. A tese foi desenvolvida em três etapas: na primeira, utilizou-se LDH do tipo hidrotalcitas. Os adsorventes foram avaliados quanto à cinética de adsorção em banho finito. O melhor sistema foi a hidrotalcita com 70 % de magnésio na composição (HT70c) com fração de sólidos (em relação ao volume de líquido) no reator  $\varepsilon_{st} = 15,0$  mg/mL usando água como solvente. O modelo de equilíbrio melhor ajustado foi o linear com os seguintes coeficientes de adsorção:  $k = 0,404; 0,602; 0,849$  e  $1,083$  L/g para  $16,5; 19,0; 21,5$  e  $24,0^\circ\text{C}$ , respectivamente, evidenciando um aumento da capacidade de adsorção com aumento da temperatura. O sistema foi avaliado termodinamicamente quanto à energia livre de Gibbs ( $\Delta G^\circ$ ), entalpia ( $\Delta H^\circ$ ) e entropia ( $\Delta S^\circ$ ), sendo que os valores calculados foram:  $\Delta G^\circ = 2,100; 1,301; 0,503$  e  $-0,295$  kJ/mol para  $16,5; 19,0; 21,5$  e  $24,0^\circ\text{C}$ , respectivamente,  $\Delta H^\circ = 94,602$  kJ/mol e  $\Delta S^\circ = 0,319$  kJ/mol.K. A segunda etapa foi desenvolvida no Laboratório de Materiais Inorgânicos da Université Blaise Pascal na França, durante Estágio de Doutorado-Sanduiche. LDH com outras composições foram sintetizados, caracterizados e avaliados quanto à adsorção de CA. A difração de raios X indicou a formação de uma estrutura cristalina com uma distância entre as lamelas de aproximadamente  $22 \text{ \AA}$ . Os espectros na região do infravermelho apresentaram sinais característicos da molécula de CA: ligações C=C ( $720 - 840, 1640$  e  $1657 \text{ cm}^{-1}$ ), C-O-C e C-N ( $1036, 1060$  e  $1292 \text{ cm}^{-1}$ ), C-N ( $1354 \text{ cm}^{-1}$ ), C-OH ( $1392 \text{ cm}^{-1}$ ) e COOH ( $1551, 1581 \text{ cm}^{-1}$ ). A análise termogravimétrica indicou a presença de uma molécula interlamelar com peso molecular de aproximadamente  $194 \text{ g/mol}$ . Essas análises confirmam a presença do CA no espaço interlamelar e, desta forma, a afinidade da molécula de

CA pelos sítios dos LDH. A adsorção de CA em diferentes fases de LDH ( $Zn_2Cr-NO_3$ ,  $Zn_2Al-NO_3$  e  $Mg_2Al-NO_3$ ) foi avaliada por meio de isotermas de adsorção a 20,0; 30,0 e 35,0°C. O sistema escolhido como mais conveniente foi o  $Zn_2Cr-NO_3$ , cujos parâmetros ajustados para o modelo de Freundlich foram  $k_F = 73,63; 128,76$  e  $229,62 \text{ mg}^{1-n_F} \cdot L^{n_F}/g$  e  $n_F = 0,35; 0,38$  e  $0,33$  para 20,0; 30,0 e 35,0°C. Na terceira etapa, partículas contendo cristais de  $Zn_2Cr-NO_3$  encapsulados em microgéis de alginato ( $LDH_{ME}$ ) foram obtidas através de gelificação iônica, a fim de possibilitar o uso desses adsorventes em colunas cromatográficas. Uma coluna foi empacotada com as partículas de  $LDH_{ME}$  a fim de avaliar a separação de CA em relação aos aminoácidos tirosina (TYR) e prolina (PRO), já que são os principais contaminantes presentes no meio fermentativo, pelo método de pulso cromatográfico. O uso das partículas de  $LDH_{ME}$  na separação de CA foi considerado satisfatório levando a fatores de purificação de 2,32 vezes o inicial e a um grau de pureza das soluções de 93 %. Um modelo matemático foi desenvolvido para adsorção de ácido clavulânico (CA) em coluna de leito fixo, empacotada com partículas  $LDH_{ME}$ . Curvas de ruptura foram obtidas experimentalmente e o sistema foi avaliado em relação aos tempos de operação assim como eficiências e produtividades em função de variações simultâneas das condições experimentais, vazão (Q) e altura de leito (L), através de um delineamento composto central rotacional (DCCR). A vazão foi avaliada no intervalo de 0,19 a 0,82 mL/min e a altura do leito de 3,0 a 5,0 cm. O algoritmo *particle swarm optimization* (PSO) se mostrou eficaz na estimação dos parâmetros do modelo proposto. Depois de validado experimentalmente em condições distintas das usadas na estimação, o modelo foi usado como ferramenta na otimização da adsorção de CA através de um DCCR, cujos resultados foram obtidos com simulações usando níveis superiores para as variáveis de entrada (Q de 0,80 a 1,50 mL/min e L de 7,0 a 10,0 cm) considerando como respostas o tempo

de ruptura ( $t_b$ ), tempo de exaustão ( $t_e$ ), eficiência de recuperação ( $\phi_{rec}$ ), eficiência de utilização da coluna ( $\phi_{col}$ ) e a produtividade (P). Esse procedimento foi considerado satisfatório já que houve diminuições consideráveis nos tempos de operação e aumentos nas respectivas eficiências e produtividades. As melhores condições de operação do sistema estudado para adsorção de CA foram:  $Q = 1,15$  mL/min e  $L = 10,0$  cm, cujas respostas foram:  $t_b = 24$  min,  $t_e = 110$  min,  $\phi_{rec} = 96$  %,  $\phi_{col} = 37$  % e  $P = 117$  kg/h.



## ABSTRACT

The main focus of this thesis was to study the adsorption of clavulanic acid (CA) in layered double hydroxides (LDH) and to use these adsorbents in fixed bed columns for separation of CA from amino acids. The thesis was developed in three steps: first, it was used LDH-type hydrotalcites. Adsorption studies were performed in stirred batch glass reactors. It was shown that distilled water and a solid/liquid ratio of 15.0 mg/L generated the most favourable conditions for adsorption. A calcined hydrotalcite containing 70 % of MgO was selected for further study since it presented the best adsorption performance. Adsorption equilibrium was evaluated from adsorption isotherms determined at different temperatures. The experimental isotherm data were well fitted by a linear equilibrium model with the corresponding adsorption constants being  $k_{lin} = 0.404, 0.602, 0.849$  and  $1.083$  L/g at 16.5, 19.0, 21.5 and 24.0°C, respectively, showing an increased adsorption capacity at higher temperatures. Thermodynamic evaluation of the process allowed the Gibbs' free energy ( $\Delta G^\circ$ ), the standard enthalpy change ( $\Delta H^\circ$ ) and the standard entropy change ( $\Delta S^\circ$ ) to be estimated as follows:  $\Delta G^\circ = 2.100, 1.301, 0.503$  and  $-0.295$  kJ/mol at 16.5, 19.0, 21.5 and 24.0°C, respectively;  $\Delta H^\circ = 94.602$  kJ/mol; and  $\Delta S^\circ = 0.319$  kJ/(mol.K), respectively. The second step was developed at the Laboratory of Inorganic Materials of the Blaise Pascal University France during a doctoral internship in France. Different LDH compositions have been investigated:  $Zn_2Cr-Cl$ ,  $Zn_2Cr-NO_3$ ,  $Zn_2Al-NO_3$  and  $Mg_2Al-NO_3$ .  $Zn_2Cr-CA$  hybrid LDH assemblies were prepared through coprecipitation method to evaluate the affinity between the CA molecule and the interlayer sites. Experiments were carried out using two different sources of CA, i.e. the pharmaceutical product Clavulin® and Clavulanate: Avicel (1:1). The

resulting inorganic-organic “sandwich” structure was characterized by a combination of techniques showing an expansion of the layered structure from 0.78 nm to values between 2.30 and 2.60 nm upon CA intercalation; a molecular sieve role of LDH host is also pointed out. Isotherms studies were carried out to evaluate the adsorption capacity of LDH towards CA in presence of contaminants such as amino acids. The Freundlich adsorption model was found to fit the data well and indicating relatively large adsorption capacity, as high as 73.63, 128.76 and 229.62  $\text{mg}^{1-n}\text{L}^n\text{g}^{-1}$  at 20, 30 and 35°C, respectively. Besides, the adsorption of CA is classified as an endothermic and spontaneous process with the following calculated thermodynamic parameters:  $\Delta H^\circ = 20.516$  kJ/mol,  $\Delta S^\circ = 0.081$  kJ/mol.K and  $\Delta G^\circ = -3.271, -4.082, -4.488$  kJ/mol for 20, 30 and 35°C, respectively. Particularly, the adsorption of CA onto  $\text{Zn}_2\text{Cr-NO}_3$  is a favorable process thus allowing us to envisage the use of LDH in CA biomolecule separation. In the third step, microparticles containing crystals of  $\text{Zn}_2\text{Cr-NO}_3$  microencapsulated in alginate ( $\text{LDH}_{\text{ME}}$ ) were obtained by ionic gelation in order to allow the use of these adsorbents in chromatography columns. A column was packed with particles of  $\text{LDH}_{\text{ME}}$  to evaluate the separation of CA from mixtures with amino acids such as tyrosine (TYR) and proline (PRO) using the chromatographic pulse methodology. The use of these  $\text{LDH}_{\text{ME}}$  microparticles in the CA separation was satisfactory leading to purification factors of 2.32 times the original and a purity of 93% of the solutions. A mathematical model has been developed for adsorption of CA in a fixed bed column packed with  $\text{LDH}_{\text{ME}}$  particles. Breakthrough curves were obtained and the system was experimentally assessed in relation to the time of operation as well as efficiencies and yields due to simultaneous variations of experimental conditions, flow rate (Q) and bed height (L) using a central composite rotatable design (CCRD), considering as responses the breakthrough time ( $t_b$ ), the

exhaustion time ( $t_e$ ), the recovery efficiency ( $\phi_{rec}$ ), the column utilization efficiency ( $\phi_{col}$ ) and the process productivity (P). The flow rate was assessed in the range from 0.19 to 0.82 mL/min and the bed height from 3.0 to 5.0 cm. The particle swarm optimization algorithm (PSO) was shown to be effective in the estimation of the parameters of the proposed model. Once validated experimentally under different conditions from those used in the estimation, the model has been used as a tool in optimizing the adsorption of CA by a CCRD, whose results were obtained using simulations with higher levels for the input variables ( $0.80 < Q < 1.50$  mL/min and  $7.0 < L < 10.0$  cm). This procedure was considered satisfactory since there were significant reductions in operating times and increases in their productivity and efficiencies. The best operating condition of the system studied for CA adsorption were:  $Q = 1.15$  mL/min and  $L = 10.0$  cm, the answers were:  $t_b = 24$  min,  $t_{rec} = 96$  %,  $\phi_{rec} = 110$  min,  $\phi_{rec} = 37\%$  and  $P = 117$  kg/h.



# **CAPÍTULO 1**

**Apresentação do trabalho e revisão bibliográfica**



## 1.1 APRESENTAÇÃO

Esta tese é apresentada em formato de artigos e foi dividida em sete capítulos. Este primeiro capítulo refere-se aos aspectos gerais do trabalho, tais como introdução ao tema, apresentação da hipótese, descrição dos objetivos e apresentação do estudo bibliográfico com relação aos aspectos teóricos e ao estado da arte. No Capítulo 2, estão apresentados os resultados referentes à adsorção de ácido clavulânico (CA) em banho finito usando hidrotalcitas, um tipo específico de hidróxidos duplos lamelares (LDH), como adsorventes. O Capítulo 3 refere-se à modelagem matemática referente ao processo do capítulo anterior, com a investigação em relação ao transporte de massa. No Capítulo 4, estão apresentados os resultados referentes ao estágio realizado na França, onde foi feita a verificação da afinidade dos sítios interlamelares dos LDH pela molécula do CA, por meio de estudos de intercalação, além do desenvolvimento de novos materiais e avaliação de seus respectivos potenciais na adsorção de CA. O Capítulo 5 reporta o desenvolvimento e caracterização de microgéis de alginato com a encapsulação de cristais de LDH selecionados no capítulo anterior, o que viabiliza a utilização desses materiais em colunas de leito fixo, além da avaliação das micropartículas obtidas quanto à separação de CA a partir de misturas complexas contendo aminoácidos. No Capítulo 6, são apresentadas curvas de ruptura de CA em colunas empacotadas com as partículas desenvolvidas no capítulo anterior, com a modelagem matemática e otimização do processo por meio de simulações usando a metodologia de planejamento experimental. Por fim, no Capítulo 7 estão relacionadas as conclusões gerais deste estudo e as sugestões para trabalhos futuros.

## 1.2 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Na contemporaneidade, é cada vez mais evidente o avanço científico e tecnológico refletidos nas mais diversas áreas de conhecimento, com destaque ao setor da biotecnologia. São inúmeras as pesquisas focadas nesse segmento acompanhadas pelo direcionamento do interesse e, conseqüentemente, investimentos do setor industrial. Devido à demanda crescente de um maior entendimento fenomenológico assim como grau de especificidade dos processos, a comunidade científica tem investido consideravelmente em nanotecnologia. Ao longo dos últimos anos, esse ramo específico vem apresentando potencial e resultados significativamente interessantes nos diferentes campos de aplicação, com destaque para as tecnologias de separação e purificação de bioprodutos, que pode ser considerado como um dos principais segmentos responsáveis pelo avanço na nanobiotecnologia. Alguns pesquisadores se referem à nanotecnologia como um setor revolucionário responsável pelo avanço social e econômico no mundo atual, caracterizando-se como peça fundamental na solução dos mais variados problemas encontrados, por exemplo, na engenharia de separação e purificação (Fan et al., 2007).

Porém, isso não implica na inexistência de lacunas e/ou possibilidades exploráveis nessa área. Hoje em dia, os bioprodutos de maior valor são produzidos em meio fermentativo, direcionando cada vez mais as atenções às etapas industriais de separação e purificação, na busca de processos inovadores que contribuam não só com aspectos técnicos, mas também com seu custo e sustentabilidade. Esse interesse pode ser explicado pelo fato de que cerca de 50 - 90 % do custo total de produção de biomoléculas estão associados à etapa de purificação (Moraes et al., 2009; Morão et al., 2006a), trazendo novos desafios às

indústrias nos processos de separação e purificação dos respectivos componentes. O ácido clavulânico é um exemplo de biomolécula-alvo bastante estudada.

Pesquisas recentes apontam o ácido clavulânico (CA) como o principal composto  $\beta$ -lactâmico produzido por *Streptomyces clavuligerus* (Saudagar et al., 2008). Apesar de não apresentar grande atividade contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, é considerado um “competidor imbatível” das  $\beta$ -lactamases, enzimas que hidrolisam o anel  $\beta$ -lactâmico e, com isso, reduzindo as eficiências dos respectivos antibióticos. Devido ao potencial anti  $\beta$ -lactamásico, esse metabólito secundário é o protagonista de diversas pesquisas relacionadas às propriedades e ação anti  $\beta$ -lactamásica (Saudagar et al., 2008; Buynak, 2006), produção (Brethauer et al., 2008; Ortiz et al., 2007; Teodoro et al., 2006), estabilidade (Bersanetti et al., 2005; Barboza et al., 2003) assim como separação/purificação (Forte, 2008; Morão et al., 2006a; Barboza et al., 2003; Brites Alves et al., 2002). A indústria farmacêutica tem demonstrado crescente interesse pelo CA, daí a importância da investigação dos métodos de obtenção com a finalidade de aperfeiçoar os mecanismos de separação e purificação.

A cada dia, novos materiais e novas estratégias de *downstream* de bioprodutos surgem na tentativa de aliar processos e materiais adsorventes alternativos, e com isso uma redução nos custos, assim como melhor aproveitamento de matéria-prima disponível, com a otimização das respectivas eficiências. Frequentemente são encontrados trabalhos na literatura sobre utilização de adsorventes considerados alternativos às resinas químicas (carvão ativo, hidrotalcitas, zeólitas e peneiras moleculares de carbono, por exemplo) na separação, purificação e/ou imobilização de biomoléculas como açúcares, aminoácidos, antibióticos, enzimas, entre outros (Forte, 2008; Kuhn, 2006; Chang et al., 2006; Hibino, 2004; Soares, 2003; Boon et al., 2000; Yu et al., 1998).

Hidróxido duplo lamelar (LDH) é um sólido mineral, em forma de pó e com diâmetro médio de partículas variável, que vem se destacando quanto ao potencial de adsorção de uma série de ânions, devido à grande área superficial apresentada nas galerias de seus nano-espacos interlamelares (Yang et al., 2006). Eles possuem camadas do tipo da brucita ( $Mg(OH)_2$ ), cujas lamelas são neutras, com os cátions magnésio localizados no centro de octaedros, que possuem em seus vértices ânions hidroxila. O domínio interlamelar dos LDH se constitui essencialmente de moléculas de água e ânions. Um grande número de ânions, tanto orgânicos como inorgânicos, pode ocupar este domínio por coprecipitação ou adsorção por simples troca iônica, daí o termo argilas aniônicas.

Apesar de não ser abundante na natureza, esse material pode ser sintetizado no laboratório a um custo relativamente baixo (Crepaldi e Valim, 1998). Vários pesquisadores têm se voltado a estudos da intercalação de diversas moléculas orgânicas em LDH tais como aminoácidos (Hibino, 2004), colágeno (Sun et al., 2008), polissacarídeos (Leroux et al., 2004), pigmentos (Tang et al., 2008) e diclofenaco (Dupin et al., 2004). Dentre esses estudos, alguns estão diretamente relacionados com processos de adsorção de moléculas como DNA (Choy et al., 1999), aminoácidos ácido aspártico, ácido glutâmico e fenilalanina (Silvério, 2004), diclofenaco (Bonina et al., 2008), corantes orgânicos (Orthman et al., 2003), herbicidas MCPA (4-cloro-2-metilfenoxiacetato) e 2,4-D (2,4-diclorofenoxiacetato) (Cardoso, 2006; Inacio et al., 2001).

Nesse contexto e levando em consideração que em condições de maior estabilidade, a molécula de CA encontra-se carregada negativamente, a utilização de LDH como adsorventes apresenta-se como uma alternativa interessante na tentativa de promover uma separação desse metabólito em relação a outros componentes provenientes do caldo fermentativo.

## 1.3 OBJETIVOS

### 1.3.1 OBJETIVO GERAL

Perante a relevância do ácido clavulânico (CA) como inibidor de  $\beta$ -lactamases, evidenciada pelo seu intenso uso na indústria farmacêutica na combinação com antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, e a necessidade de inovações tecnológicas na busca de processos alternativos de biosseparação, o presente trabalho tem como escopo principal a avaliação da adsorção de CA em LDH bem como o estudo de separação e purificação do CA a partir de soluções mistas em presença de contaminantes utilizando leito fixo de LDH.

### 1.3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Avaliação da cinética de hidrólise de CA por meio de planejamentos fatoriais;
- b) Estudos cinéticos de adsorção para seleção do melhor solvente (água destilada ou tampão fosfato) para preparação das soluções de CA;
- c) Estudos cinéticos para definição da melhor fração de sólidos no reator;
- d) Comparação entre as cinéticas de adsorção usando as diferentes hidrotalcitas calcinadas e seleção da hidrotalcita HT70c para realização das etapas seguintes;
- e) Estudo do equilíbrio de adsorção de CA na hidrotalcita HT70c com a determinação de isotermas de adsorção em diferentes temperaturas e estimação dos parâmetros a partir do ajuste de diferentes modelos de adsorção aos dados experimentais;

f) Caracterização termodinâmica do processo de adsorção de CA na hidrotalcita HT70c;

g) Caracterização da hidrotalcita selecionada, em termos de densidade, área superficial e estrutura porosa, morfologia superficial, estrutura cristalina (espaçamento basal) e composição;

h) Modelagem matemática do sistema de reator de mistura em batelada com a determinação de parâmetros cinéticos e de transporte da adsorção de CA nas hidrotalcitas calcinadas (HT30c, HT63c e HT70c) e análise de sensibilidade paramétrica;

i) Estudo da intercalação da molécula de CA por coprecipitação de LDH e caracterização das fases obtidas;

j) Avaliação do equilíbrio de adsorção de CA utilizando a fase LDH selecionada ( $Zn_2Cr-NO_3$ ) como adsorvente em diferentes temperaturas;

k) Isotermas de adsorção de CA no LDH  $Zn_2Cr-NO_3$  com a presença de aminoácidos e avaliação termodinâmica do processo;

l) Microencapsulação de cristais do LDH  $Zn_2Cr-NO_3$  em géis de alginato, viabilizando o empacotamento em colunas de leito fixo e caracterização das microcápsulas;

m) Avaliação da separação de CA a partir de misturas complexas contendo aminoácidos em coluna de leito fixo usando o método de pulsos cromatográficos;

n) Obtenção de dados experimentais, otimização das condições operacionais, modelagem matemática e simulação do sistema de adsorção usando metodologia de curvas de ruptura.

## 1.4 ESTRATÉGIAS TOMADAS NO TRABALHO

Este trabalho fez parte dos objetivos propostos no projeto temático aprovado pela FAPESP com o título de “Produção e purificação de ácido clavulânico, cefamicina C e outros metabólitos bioativos de *Streptomyces*”, (Proc. 05/55079-4) sendo uma cooperação entre o Laboratório de Engenharia de Bioprocessos (LEB) da Faculdade de Engenharia de Alimentos (FEA)/UNICAMP com o Laboratório de Engenharia Bioquímica do Departamento de Engenharia Química (DEQ)/UFSCar.

Em um primeiro momento, foram realizados estudos cinéticos de adsorção de CA utilizando LDH do tipo hidrotalcitas, maior representante do grupo. Esses adsorventes foram doados por uma empresa alemã (Sasol Germany Gmb. H.) em diferentes composições, dos quais um foi selecionado como mais adequado. No entanto, identificou-se a necessidade de entender melhor o processo e conhecer mais profundamente o fenômeno de intercalação da molécula no interior dos adsorventes assim como caracterizar de forma mais concreta essa adsorção. Dessa forma, surgiu a oportunidade de realização de estágio sanduíche no exterior.

A segunda etapa foi desenvolvida no Laboratório de Materiais Inorgânicos da Université Blaise Pascal na França, laboratório especializado nesse tipo de material durante Estágio de Doutorado-Sanduíche. LDH com outras composições foram sintetizados, caracterizados e avaliados quanto à adsorção de CA. A afinidade dos LDH pelo CA foi observada através da intercalação da molécula durante a síntese dos sólidos pelo método de coprecipitação. Os pós sintetizados foram caracterizados para verificar a presença da molécula de CA em suas estruturas. Escolhido o melhor adsorvente, o mesmo foi produzido em escala piloto e trazido para o Brasil para a realização dos ensaios em coluna de leito fixo.

No entanto, por apresentarem dificuldade de empacotamento em colunas, foi necessário o desenvolvimento de mais uma etapa não prevista. Isso foi resolvido com a microencapsulação dos cristais do adsorvente em microgéis de alginato e então as partículas foram usadas em colunas de leito fixo para adsorção de CA.

## 1.5 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 1.5.1 BIOPROCESSOS E *DOWNSTREAM*

A biotecnologia pode ser considerada como o setor de maior ascensão nos últimos anos. No mundo inteiro, tanto no campo de pesquisa como na indústria, esforços têm sido direcionados na tentativa de um maior e mais eficiente aproveitamento dos recursos naturais, observados nas mais diversas áreas de aplicação, como o setor energético, alimentício, farmacêutico, agropecuário entre outros. De acordo com a definição proposta na Convenção sobre Diversidade Biológica da Organização das Nações Unidas (ONU, 1992), "Biotecnologia define-se pelo uso de conhecimentos sobre os processos biológicos e sobre as propriedades dos seres vivos, com o fim de resolver problemas e criar produtos de utilidade." Em outras palavras, na biotecnologia utiliza-se das mais diversas cepas de micro-organismos, células animais e células de plantas na produção de produtos úteis para seres humanos (Belter et al., 1988). Pesquisadores se dedicam a descobrir novas tecnologias e estratégias para o desenvolvimento de bioprocessos, sobretudo na etapa de *upstream*, compreendendo desde o isolamento, seleção, identificação e melhoramentos genéticos de micro-organismos até a otimização da produção e *scale-up*.

Normalmente, em processos fermentativos o crescimento do micro-organismo é controlado com a finalidade de garantir o máximo rendimento do produto desejado, que pode estar presente no caldo de fermentação (excretado pelo micro-organismo) ou no interior de suas células. Dessa forma, o processo pode ser classificado quanto à localização da biomolécula alvo como extracelular ou intracelular (Paredes, 1996). Produtos extracelulares são aqueles que estão dissolvidos no caldo de fermentação, geralmente em porcentagens bastante pequenas e que apresentam baixa estabilidade, de modo que necessitam de operações mais rápidas e relativamente sofisticadas. Dentre eles podemos destacar proteínas, aminoácidos, antibióticos, gomas, ácidos orgânicos ou outras macromoléculas orgânicas. Os produtos intracelulares são moléculas retidas no interior do organismo.

No entanto, a etapa mais dispendiosa em termos econômicos e tecnológicos ainda é a etapa de separação e purificação (*downstream*) dos bioprodutos. Independentemente do organismo envolvido na produção, o material sintetizado é composto por uma mistura complexa contendo, além da biomolécula alvo, os mais variados tipos de moléculas, dependendo de cada caso. Sabe-se que essa etapa é responsável por no mínimo 50 % do custo total de produção de bioprodutos, podendo chegar a patamares maiores que 90 %, quando se processa produtos de alto valor agregado. Apesar de toda essa importância, os processos de *downstream* ainda compreendem um setor que pode ser considerado carente.

#### **1.5.1.1 *Downstream processing***

*Downstream processing* pode ser entendido como um conjunto de operações unitárias visando à separação de produtos biotecnológicos. Esses processos requerem grandes espaços físicos e envolvem altos investimentos por utilizarem

equipamentos caros, de forma que os fenômenos e estratégias devem ser bem entendidos e rigorosamente planejados (Almeida, 2003; Bjurstrom, 1985). Os processos de biosseparação podem ser idealizados em quatro grandes grupos: remoção de moléculas insolúveis, isolamento do produto, purificação e polimento.

A remoção de insolúveis reflete a origem de muitos materiais sintetizados biologicamente como soluções diluídas produzidas por fermentação, misturadas ao material celular. Como comentado, há casos em que o bioproduto está no interior e outros onde o mesmo encontra-se em solução. Em ambos os casos, sugere-se que haja a remoção das células, obtendo-se o caldo clarificado, para um melhor processamento desse material. Esse estágio específico pode ser desenvolvido por filtração, centrifugação ou, nos casos onde o produto é intracelular, por rompimento das células após separação da fase líquida (Belter et al., 1988). No isolamento do produto, ou isolamento primário, há a remoção de produtos com propriedades divergentes quando comparados às do produto desejado, com aumento da concentração. Esse estágio engloba extração com solvente (ou de duas fases aquosas) e adsorção (Almeida, 2003). Na purificação, são desenvolvidas técnicas altamente seletivas, das quais se destacam: precipitação fracionada, cromatografia, eletroforese e adsorção. O polimento pode compreender operações de cristalização, centrifugação e secagem, pode ser entendido como a separação final do produto e, por essa razão, a escolha da operação a ser usada depende intrinsecamente da forma de comercialização do produto (Paredes, 1996).

### 1.5.2 ANTIBIÓTICOS $\beta$ -LACTÂMICOS E $\beta$ -LACTAMASES

A descoberta dos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos no início do século vinte representou um ponto de partida no combate às bactérias patogênicas. Estes

compostos relativamente baratos e altamente eficientes, têm sido o foco principal da quimioterapia anti-infecciosa nos últimos sessenta anos (Buynak, 2006).

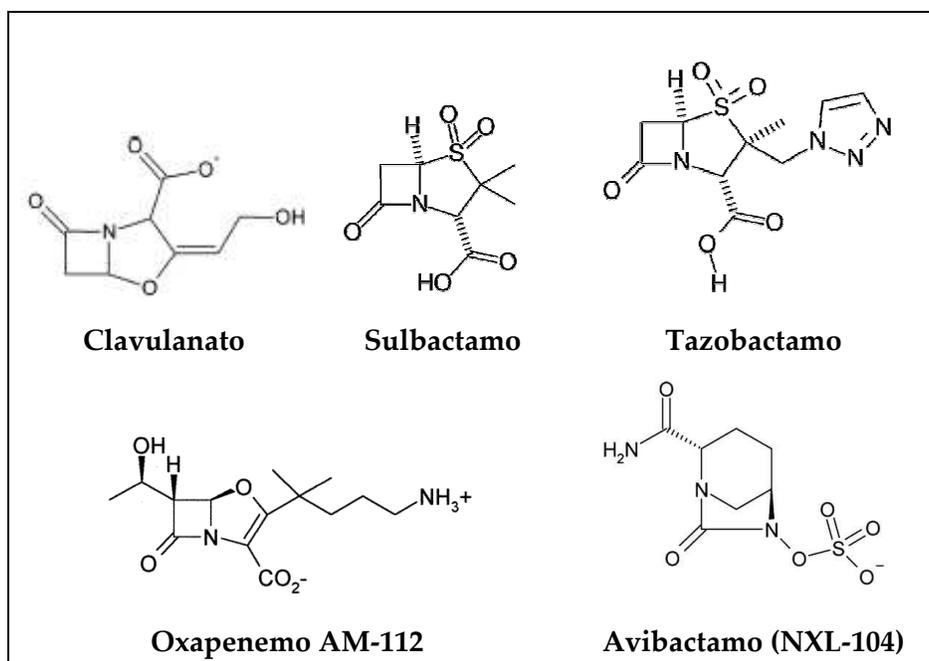
Os compostos  $\beta$ -lactâmicos obtidos a partir de fontes naturais são classificados como: penicilinas, cefalosporinas, carbapenemas, clavamas ou subfamílias de  $\beta$ -lactâmicos monocíclicos (Hamed et al., 2013). As penicilinas e cefalosporinas foram os pioneiros no combate às infecções bacterianas. No entanto, seu uso em larga escala acabou reproduzindo uma redução da eficiência, devido à resistência adquirida pelos micro-organismos patogênicos (Li e Townsend, 2006).

Algumas bactérias patogênicas, em seu mecanismo de defesa, produzem  $\beta$ -lactamases, enzimas que hidrolisam os anéis  $\beta$ -lactâmicos dos antibióticos, como penicilina e cefalosporina, formando derivados de ácidos carboxílicos (penicilóico) ou subprodutos análogos (Baggaley et al., 1997). As  $\beta$ -lactamases são divididas em quatro classes: A, B, C e D, sendo três delas (A, C e D) representadas por enzimas que contêm grupo serina (serina- $\beta$ -lactamases). A classe B é composta pelas metalo- $\beta$ -lactamases (Hamed et al., 2013; Drawz e Bonomo, 2010; Page, 2000).

Estudos relacionados com o desenvolvimento de métodos, na tentativa de superar essa resistência adquirida pelos patogênicos, têm se evidenciado nos últimos anos. Esses esforços são necessários também na prevenção de resistências às classes futuras de antibióticos (Buynak, 2006). Uma estratégia razoavelmente eficaz no combate à resistência das  $\beta$ -lactamases é a combinação de antibióticos  $\beta$ -lactâmicos com um inibidor de uma ou mais enzimas hidrolíticas (Maiti et al., 1998). Tais inibidores reagem com o grupo serina ativo das  $\beta$ -lactamases formando um complexo acil-enzima havendo, com isso, a inativação das  $\beta$ -lactamases (Hamed et al., 2013). Como essas substâncias não apresentam atividade

antibacteriana significativa, elas costumam ser usados na combinação com antibióticos.

Esses inibidores apresentam-se com maior frequência na forma de sais de ácido clavulânico, sulbactamo e tazobactamo (Hamed et al., 2013; Buynak, 2006; Payne et al., 1994). Recentemente, novos compostos com atividade anti- $\beta$ -lactamásica têm sido citados, tais como o AM-112, um oxapenemo (Hamed et al., 2013; Jamieson et al., 2003), e o NXL-104 (avibactamo), um composto  $\beta$ -lactâmico sintético (Hamed et al., 2013; Endimiani et al., 2011). As estruturas dos inibidores mais comuns estão apresentadas na Figura 1.1.



**Figura 1.1:** Inibidores de  $\beta$ -lactamases atualmente mais frequentes. Fonte: Hamed et al. (2013).

Existem no mercado vários produtos que combinam antibióticos com inibidores de  $\beta$ -lactamases, como por exemplo: Augmentin<sup>®</sup> (amoxicilina/clavulanato) (Stein e Gurwith, 1984), Timentin<sup>®</sup>

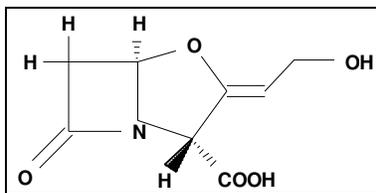
(ticarcilina/clavulanato) (Reed, 1998), Unasyn<sup>®</sup> (ampicilina/sulbactamo) (Lode, 2001) e o Zosyn<sup>®</sup> (piperacilina/tazobactamo) (Bryson e Brogden, 1994).

No entanto, os inibidores de  $\beta$ -lactamases conhecidos atualmente são eficientes apenas quanto à inibição de uma das três classes das serina- $\beta$ -lactamases (classe A), ou seja, não inibem as metalo- $\beta$ -lactamases (classe B) nem as outras serina- $\beta$ -lactamases (classes C e D) (Hamed et al., 2013; Drawz e Bonomo, 2010; Page, 2000).

### 1.5.3 ÁCIDO CLAVULÂNICO (CA)

A descoberta do CA se deu na segunda metade dos anos 70 (Brown et al., 1976; Reading e Cole, 1977), e sua combinação com amoxicilina vem sendo usada há mais de 20 anos no combate às bactérias produtoras de enzimas  $\beta$ -lactamases. De acordo com Saudagar et al. (2008), os produtos comerciais à base de CA, por exemplo o Augmentin<sup>®</sup> (amoxicilina/CA) e Timentin<sup>®</sup> (ticarcilina/CA), têm gerado uma renda de 1 bilhão de dólares por ano, citando como principais fabricantes Glaxo SmithKline (USA), Lek D.D. (Eslovênia) e CIPAN (Portugal). Esses produtos são prescritos em mais de 150 países (Elander, 2003) dentre os quais o Brasil, onde o produto mais comercializado é o Clavulin<sup>®</sup> (amoxicilina/CA).

O CA é um composto  $\beta$ -lactâmico, cuja molécula é produzida pelo micro-organismo filamentoso *Streptomyces clavuligerus* e consiste em um anel  $\beta$ -lactâmico e um anel oxazolidino (Howarth et al., 1976; Reading e Cole, 1977), como pode ser visto na Figura 1.2.



**Figura 1.2:** Estrutura química do ácido clavulânico (CA).

Esse metabólito secundário é considerado o principal composto  $\beta$ -lactâmico produzido por esse micro-organismo (Saudagar et al., 2008). Juntamente, pelo menos mais 20 metabólitos secundários (incluindo outros compostos

$\beta$ -lactâmicos) são produzidos a partir dessa bactéria, que não é capaz de metabolizar a glicose (Almeida, 2003). A biossíntese do CA está ilustrada na Figura 1.3 (Oliveira et al., 2009). Apesar de não demonstrar grande eficiência no combate às bactérias patogênicas Gram-positivas e Gram-negativas (Kim et al., 2001) apresenta atividade anti  $\beta$ -lactamásica bastante significativa (Barboza et al., 2003), isto é, atua como inibidor de enzimas  $\beta$ -lactamases, competindo com as mesmas e facilitando a ação dos respectivos antibióticos.

Buynak (2006) constatou que o estudo do mecanismo de inativação de  $\beta$ -lactamases pelo CA iniciou-se no final dos anos 70 (Charnas et al., 1978), o qual é usado como componente anti  $\beta$ -lactamásico, como comentado anteriormente. Segundo Brown et al. (1976), em presença de baixas concentrações de CA, grande parte das bactérias produtoras de  $\beta$ -lactamases torna-se tão sensíveis às penicilinas e cefalosporinas quanto outros micro-organismos não produtores de  $\beta$ -lactamases. Alguns estudos mostram que o CA é um inibidor mais potente do que o sulbactamo para diversas  $\beta$ -lactamases de espectro expandido (Payne et al., 1994).

Ele apresenta alta instabilidade em função da temperatura e pH, sendo a degradação mais pronunciada em condições de temperaturas superiores a 30°C e valores de pH maiores que 7,0 e menores que 5,0 (Bersanetti et al., 2005; Almeida, 2003; Bersanetti et al., 2000; Haginaka et al., 1981). Em condições de boa estabilidade ( $T < 10^{\circ}\text{C}$  e  $\text{pH} = 6,2$ ), o CA é encontrado em sua forma aniônica, conforme ilustrado na Figura 1.4.

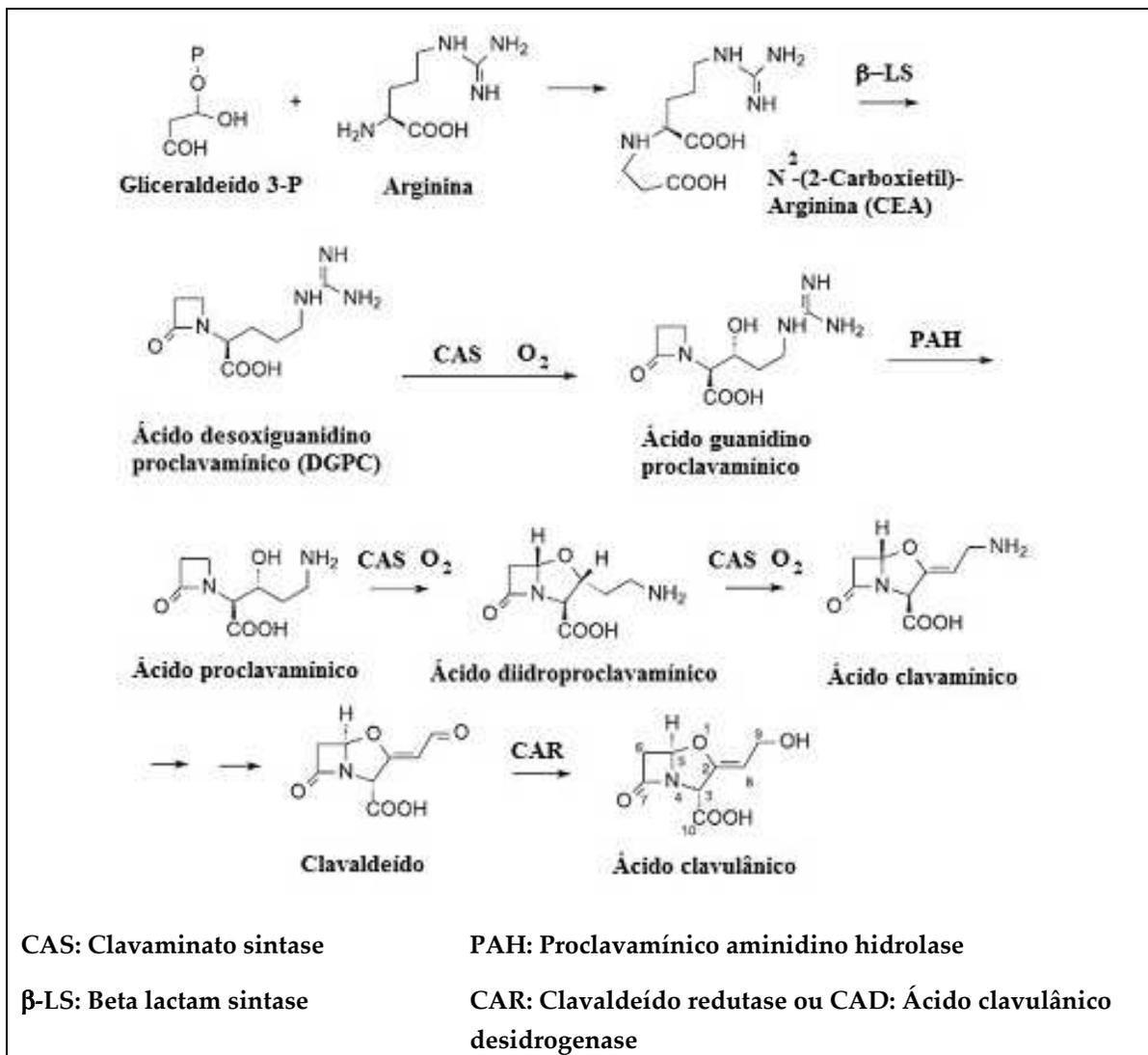
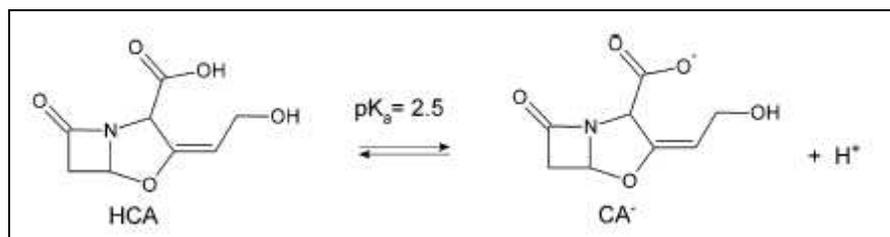


Figura 1.3: Biossíntese do ácido clavulânico (CA). Fonte: Oliveira et al. (2009).



**Figura 1.4:** Dissociação da molécula do ácido clavulânico em clavulanato (CA<sup>-</sup>).

Fonte: Morão et al. (2008).

O processo de purificação do CA inclui uma série de etapas. Após o final da fermentação, o caldo contendo CA é clarificado por centrifugação e/ou filtração (Butterworth, 1984). O caldo clarificado é então submetido a etapas de extração primária envolvendo extração líquido-líquido seguidas de processos de adsorção (Silva et al., 2012). No entanto, essa etapa apresenta rendimentos relativamente baixos devido a ausência de grupos fortemente hidrofóbicos (Mayer et al., 1996) e à alta instabilidade da molécula em função principalmente da temperatura e pH (Forte et al., 2012a; Bersanetti et al. 2005). Observando isso, Saudagar et al. (2008) ratificaram que para o desenvolvimento de um processo de adsorção ou separação mais eficiente e seletivo, o efeito de condições operacionais como temperatura, pH, e concentração do adsorbato na cinética e equilíbrio de adsorção devem ser mais detalhadamente investigados e compreendidos.

### 1.5.3.1 Estabilidade do ácido clavulânico (CA)

A hidrólise de um composto consiste em uma reação homogênea em solução, onde a água participa como um dos reagentes, catalisada por ácidos ou bases. A molécula de água, devido ao seu caráter anfótero, pode funcionar como ácido (doando prótons) ou como bases (recebendo prótons) (Almeida, 2003).

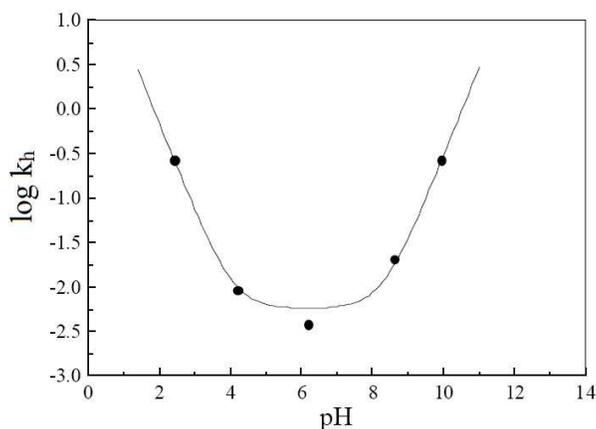
A velocidade de quebra do anel  $\beta$ -lactâmico está diretamente relacionada com a concentração de íons  $H^+$  e  $OH^-$  presentes em solução e com a temperatura (Bersanetti et al., 2005). Alguns autores sugeriram que a degradação do CA segue a cinética de pseudoprimeira ordem (Haginaka et al., 1981; Bersanetti et al., 2000), representada pela equação 1.1,

$$-\frac{dC}{dt} = k_h C \quad (1.1)$$

onde  $k_h$  é a constante de hidrólise de CA ( $\text{min}^{-1}$  ou  $\text{h}^{-1}$ ) e  $C$  é a concentração de CA em solução ( $\text{mg/L}$ ).

Haginaka et al. (1981) estudaram a estabilidade do CA a  $35^\circ\text{C}$  e força iônica de 0,5 a diferentes pHs e observaram que a constante de degradação do mesmo é altamente influenciada pelo pH. A máxima estabilidade foi atingida em pH 6,39. Os mesmos autores observaram que o aumento da concentração de tampão favorece o processo de degradação de CA.

Bersanetti et al. (2000) concluíram que a estabilidade do CA a  $20^\circ\text{C}$  e força iônica de 0,5 é maior em pH em torno de 6,0. Esses autores também relacionaram a constante de hidrólise de CA em solução aquosa com valores de pH (Figura 1.5), observando que as velocidades de degradação em condições básicas são cerca de 40 vezes maiores que as em condições ácidas e que a força iônica não influencia tal constante, nos intervalos investigados.



**Figura 1.5:** Efeito do pH na constante de hidrólise do ácido clavulânico (CA) a 20°C e força iônica de 0,5. Fonte: Bersanetti et al. (2000).

Tendo em vista a dependência da velocidade de hidrólise de CA em relação ao pH, Bersanetti (2001) sugeriu a equação adotada por Konecny et al. (1973) para comportamentos típicos de reações susceptíveis à catálise ácido-base específica:

$$k_h = k_a [H^+] + k_n + k_b [OH^-] \quad (1.2)$$

onde  $k_a$ ,  $k_n$  e  $k_b$  são as constantes parciais de hidrólise em meios ácidos, neutros e básicos, respectivamente.

Bersanetti et al. (2005), estudando a cinética de degradação do CA a partir de diversas fontes (mistura com  $SiO_2$ , produto farmacêutico Clavulin® e caldo de fermentação), relataram que a estabilidade de CA diminui com o aumento da temperatura, independente da fonte e que as constantes de degradação de CA de fermentação são maiores que aquelas obtidas nos experimentos em solução aquosa (mistura com  $SiO_2$  e Clavulin®) tanto em pH 6,2 quanto em pH 7,0. Os mesmos autores justificaram tal fato pela possível presença de alguns componentes no meio fermentativo, como compostos amoniacaais, que aumentam a instabilidade do CA.

Mayer e Deckwer (1996a) estudaram a produção e decomposição simultânea de CA durante cultivos com *Streptomyces clavuligerus* em meio complexo contendo extrato de soja. A estabilidade do composto *in vitro* (ausente de células) e *in vivo* foram avaliadas. As constantes de degradação para os ensaios *in vivo* foram 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*, como indicado pela dependência da constante de degradação com o pH, alguns mecanismos adicionais estariam ativos na degradação *in vivo* de CA nos cultivos com meios contendo o extrato da farinha de soja.

### 1.5.3.2 Separação e purificação do ácido clavulânico (CA)

O processo de purificação do CA inclui uma série de etapas: após a fermentação o caldo é clarificado por filtração ou centrifugação sendo a massa celular de *Streptomyces clavuligerus* descartada; Pesquisas verificaram que o isolamento primário do CA pode ser feito tanto por extração líquido-líquido como por adsorção (O'Sullivan e Sykes, 1986). Os autores mencionaram alguns trabalhos de recuperação do CA tais como: adsorção sobre 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) bem como em Zerolite SRA61, seguida de eluição com cloreto de sódio e subsequente dessalinização em Amberlite XAD4 ou resinas Hokeutsu (Box, 1980, apud O'Sullivan e Sykes, 1986).

Butterworth (1984) descreveu outro processo para a extração primária do CA proveniente de caldo fermentativo. O caldo clarificado é difundido em coluna de adsorção com resina aniônica fortemente básica e eluição da coluna com solução aquosa de um sal, seguindo-se etapas de adsorção em resinas XAD4 e Zerolite

SRA 62. O meio é finalmente desmineralizado em resina XAD4. O produto final com alta pureza é obtido por liofilização ou por cristalização da solução aquosa.

Mayer et al. (1996) e Mayer et al. (1997) desenvolveram um sistema com base na formação de um par iônico no qual 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 CA. Para se comparar o desempenho desse sistema foram feitos testes com uma tradicional resina de troca iônica, a Amberlite IRA400. O uso da cromatografia com formação de par iônico apresentou-se como uma alternativa viável e eficiente na purificação de CA, a resina XAD4 com sais de amônio quaternário mostrou melhor desempenho que IRA400.

Bersanetti (2001) pesquisou sobre a adsorção de CA em diferentes resinas de troca iônica. Com a determinação da faixa de pH de maior estabilidade do CA foi possível estabelecer valores adequados para investigação da adsorção deste composto nas resinas XAD4, XAD761 e IRA400. A taxa de recuperação foi muito elevada com a resina de troca iônica IRA400, em torno de 95 %. A partir dos estudos de adsorção com a resina IRA400, o autor relatou um rendimento de dessorção dos íons clavulanato com soluções de cloreto de sódio (5 % e 10 %), considerando-o satisfatório, correspondendo a aproximadamente 70-75 % com relação à quantidade inicialmente adsorvida.

Barboza et al. (2002a) avaliaram os parâmetros cinéticos intrínsecos da adsorção de CA em resinas de troca iônica. As soluções de CA foram preparadas a partir de uma mistura SiO<sub>2</sub>/clavulanato de potássio (1:1), na qual a molécula de CA apresenta maior estabilidade, em concentrações iniciais variando de 90 a 1000 mg/L. O primeiro passo do trabalho foi determinar a difusividade do CA nos

poros da resina IRA400 a partir de um modelo baseado na difusão com adsorção instantânea. No entanto, a cinética de adsorção demonstrou efeito significativo e o modelo matemático proposto considerou tanto a cinética de adsorção quanto os efeitos difusionais. Ensaio foram realizados em frascos agitados de 200 mL com pH inicial controlado em 7,0 e a uma temperatura constante de 10°C. Os parâmetros de transporte variaram conforme a concentração inicial, sendo estimados valores para o coeficiente de filme e difusividade efetiva na ordem de  $k_f \approx 10^{-2}$  cm/s e  $D_{ef} \approx 10^{-5}$  cm<sup>2</sup>/min, respectivamente. Os resultados do sistema estudado mostraram que ambos os aspectos de taxa de reação e resistências ao transporte de massa devem ser considerados.

Barboza et al. (2002b) realizaram estudos semelhantes na adsorção de CA em resinas IRA400, porém com soluções de CA obtidas a partir de caldos de fermentação. Os experimentos foram feitos em frascos agitados de 200 mL, em diferentes condições de pH inicial (6,2 e 4,0) e temperatura (10°C e 20°C na adsorção e 30°C na dessorção). Foram obtidos dados cinéticos, de equilíbrio e de transporte de massa. A difusividade efetiva ( $D_{ef}$ ) mostrou alta sensibilidade em relação à concentração inicial de CA ( $C_0$ ), passando de  $9 \times 10^{-5}$  cm<sup>2</sup>/s (nas condições  $C_0 = 900$  mg/L,  $T = 10^\circ\text{C}$  e  $\text{pH} = 6,2$ ) para  $1 \times 10^{-5}$  cm<sup>2</sup>/s (nas condições  $C_0 = 1400$  mg/L,  $T = 10^\circ\text{C}$  e  $\text{pH} = 6,2$ ), enquanto que os parâmetros cinéticos ( $k_1$  e  $k_2$ ) e o coeficiente de filme ( $k_f$ ) mantiveram-se constantes com a mesma variação ( $k_1 = 1,7$  L/g.min;  $k_2 = 0,13$  min<sup>-1</sup>;  $k_f \approx 6 \times 10^{-2}$  cm/s).

Brites Alves et al. (2002) avaliaram o isolamento de CA de caldos fermentativos industriais através da extração por solventes precedida pela concentração por meio de filtração com membranas. Os autores concluíram que as membranas cerâmicas utilizadas, com tamanho de poro de 150 kDa, proporcionaram altas vazões de permeação. No entanto, os permeados obtidos por

essa tecnologia apresentaram complicações no momento das extrações com solvente devido à presença de proteínas. A utilização de membranas de 20 e 15 kDa proporcionaram permeados mais puros e a extração por solventes foi favorecida. A metodologia de nanofiltração foi decisiva na etapa de concentração dos permeados, viabilizando tanto a extração com solventes como a utilização de resinas.

Barboza et al. (2003) investigaram a influência da temperatura na adsorção de CA na resina IRA400, envolvendo estudos cinéticos e de equilíbrio em um sistema adsorptivo em batelada a quatro diferentes temperaturas (5, 10, 23 e 30°C). As soluções de CA foram preparadas a partir da mistura SiO<sub>2</sub>/clavulanato de potássio (1:1) e em concentrações iniciais variando de C<sub>0</sub> = 100 mg/L. Um modelo para a referida adsorção foi proposto e parâmetros termodinâmicos, tais como entalpia ( $\Delta H^\circ$ ), entropia ( $\Delta S^\circ$ ) e energia livre de Gibbs ( $\Delta G^\circ$ ) foram levados em consideração. O estudo do equilíbrio forneceu os seguintes parâmetros da isoterma de Langmuir: quantidade máxima adsorvida no equilíbrio  $q_m = 15, 23, 25$  e  $27$  mg/g para T = 5, 10, 23 e 30°C, respectivamente, e constante de dessorção  $k_d = 31, 39, 72$  e  $86$  mg/L para T = 5, 10, 23 e 30°C, respectivamente. O processo foi caracterizado como exotérmico com um valor de entalpia  $\Delta H^\circ = -29$  kJ/mol. Os parâmetros de transporte foram mais sensíveis à temperatura que à concentração inicial. Os valores estimados para o coeficiente de filme e difusividade efetiva foram na ordem de  $k_f \approx 10^{-2}$  cm/s e  $D_{ef} \approx 10^{-5}$  cm<sup>2</sup>/min, respectivamente.

Almeida et al. (2003) utilizaram dados de adsorção de CA na resina IRA400 para modelar e simular um sistema contínuo de adsorção em batelada. Essas simulações possibilitaram a estimação de rendimento, concentração e fatores de purificação do processo. Experimentos foram realizados adotando as condições selecionadas no estágio de simulação. A partir de comparações entre os resultados

simulados e os obtidos experimentalmente, o ajuste foi considerado satisfatório e foi possível concluir que o modelo proposto é capaz de prever adequadamente o processo contínuo em batelada de adsorção de CA na resina IRA400.

Membranas de nanofiltração (NF) foram utilizadas focando a purificação de CA produzido industrialmente por fermentação (Morão et al., 2006a; Morão et al., 2006b; Morão et al., 2006c). Os autores associaram o declínio no fluxo de permeado aos escoamentos tangenciais às superfícies das membranas o que, segundo Silva (2010), causa um impacto econômico negativo, exigindo um estágio a mais de diafiltração que, por sua vez, produz caldos mais diluídos.

Forte (2008) estudou a separação de CA a partir de injeções de caldo fermentativo em coluna de leito fixo de zeólitas 13X-Na. Foram observados melhores resultados na separação de CA e proteínas usando tampão fosfato (0,2 M e pH 6,2) como eluente e frações de zeólitas na granulometria 0,053 - 0,062 mm. A eficiência de separação (ES), fator concentração (FC), fator de purificação referente às proteínas (FPP) e fator de purificação referente aos contaminantes totais (FPC) apreciados nessas condições foram, respectivamente: ES = 0,38; FC = 0,40; FPP = 1,25 e FPC = 1,28.

Forte et al. (2009a) e Forte et al. (2009b) avaliaram as melhores condições operacionais para separação de CA de caldo fermentativo a partir de um sistema cromatográfico de leito fixo de zeólitas 13X-Na. Foi realizado um planejamento experimental fracionado para avaliar os efeitos da temperatura (T), de 10 a 30°C, concentração de tampão ( $C_T$ ), de 0,02 a 0,20 M, volume de injeção ( $V_i$ ), de 1,0 a 3,0 mL e vazão de alimentação (Q), de 0,1 a 0,2 mL/min, nas respostas eficiência de separação (ES) e porcentagem de massa recuperada (MR). Nos níveis estudados, o aumento na concentração de tampão ocasionou aumento em ambas as respostas e

o aumento na temperatura promoveu diminuição na massa recuperada. Os efeitos causados pelo volume injetado e vazão de alimentação não foram estatisticamente significativos. Os melhores resultados obtidos para as respostas foram: ES = 1,6 e MR = 89 %, as quais foram encontradas nas condições do ponto central: T = 20°C; C<sub>T</sub> = 0,11 M; V<sub>i</sub> = 2,0 mL e Q = 0,15 mL/min.

Hirata et al. (2009) promoveram a precipitação de CA pela reação direta com 2-etil hexanoato de potássio. Os precipitados apresentaram boa cristalinidade e estabilidade e foram analisados por ressonância magnética nuclear (RMN). Os autores reportaram rendimentos de 70 % de recuperação.

Silva et al. (2009) estudaram a purificação de CA em sistemas de duas fases aquosas (SDFa) de tampão fosfato e soluções de polietileno glicol (PEG) com diferentes massas molares. Os autores verificaram que as condições ótimas do processo foram usando PEG 400, pH 6,4 e razão entre volumes de cada fase de 1,3; alcançando rendimentos de recuperação de aproximadamente 100 % e fatores de purificação de 1,5.

Silva (2010) avaliou a separação de CA a partir de caldos fermentativos usando diferentes técnicas. Esse estudo apresentou de forma integrada os resultados observados por Silva et al. (2009) e Silva et al. (2012). Foi observado que o sistema de purificação utilizando SDFa, quando operado continuamente, pode ser um intermediário integrando operações de purificação anteriores por ultrafiltração (UF) e posteriores por cromatografia de troca iônica ou reações de precipitação. A sequência proposta para a extração completa de CA foi a seguinte: como primeira etapa, utilização de membranas de microfiltração (MF) com tamanho de poro de 0,2 µm, pressão transmembrana de 98 kPa, temperatura de 11°C e vazão de alimentação de 21,6 L/h; na segunda etapa, utilização de

membranas de UF de 50 kDa, pressão transmembrana de 80 kPa, temperatura de 20°C e vazão de alimentação de 21,6 L/h; para a terceira etapa, foi proposta o uso do SDFa e finalmente, após a precipitação dos sais da fase de topo do SDFa com etanol, utilizou-se a resina Streamline QXL para a re-extração da fase de topo, concentração e a purificação do CA.

Cuel et al. (2011) apresentou uma proposta interessante, usando termos de degradação de CA na modelagem matemática de curvas de ruptura de CA em resinas Amberlite IRA400. O trabalho apresentou o modelo e estimativas de parâmetros cinéticos, de equilíbrio e de transporte, aliando métodos matemáticos de soluções numéricas com correlações de números adimensionais. Os parâmetros estimados foram coeficiente de filme,  $k_f \approx 10^{-1}$  cm/min, dispersão axial,  $D_{ax} \approx 2$  cm<sup>2</sup>/min e constante de hidrólise de CA,  $k_h \approx 10^{-1}$  min<sup>-1</sup>.

Carvalho et al. (2011) avaliaram o uso de NF na separação entre clavulanato de potássio e cloreto de potássio. Membranas de poliamida apresentaram melhor desempenho comparadas com as polietersulfônicas e a seletividade foi maior para pressões mais elevadas e pHs mais baixos.

Forte et al. (2011a) utilizaram zeólitas natural e sintética do tipo faujasita (13X), ambas modificadas por troca iônica com diferentes cátions de compensação (Na<sup>+1</sup>, K<sup>+1</sup>, Ca<sup>+2</sup>, Ba<sup>+2</sup>, Mg<sup>+2</sup>, Sr<sup>+2</sup>). Através de estudos cinéticos de adsorção de CA, a zeólita selecionada foi a 13X-Na. No equilíbrio, houve retenção de 17,4 % do CA e a quantidade de CA adsorvida, em relação à quantidade de zeólita ( $q^*$ ) foi 0,5 mg/g. Isotermas de adsorção nas temperaturas 10, 15 e 20°C, usando 13X-Na e soluções de CA puro, foram determinadas e constatou-se que, nos intervalos de temperaturas e concentrações estudados, o aumento da temperatura desfavoreceu tal processo.

Forte et al. (2011b) investigaram a adsorção de CA utilizando zeólitas em diferentes formas catiônicas em um sistema de batelada. Foram usadas soluções de CA preparadas a partir do produto farmacêutico Clavulin® em concentrações iniciais  $C_0 = 250$  mg/L e a uma temperatura  $T = 15^\circ\text{C}$ . Um modelo matemático foi usado tendo em conta o transporte de CA da fase líquida para o interior da fase sólida. Esse estudo baseou-se em aspectos cinéticos e de transporte de massa, onde os parâmetros estimados para a zeólita 13X-Na foram:  $k_1 \approx 3 \times 10^{-3}$  L/mg.min,  $k_2 \approx 7 \times 10^{-3}$  min<sup>-1</sup>,  $k_f \approx 3 \times 10^{-8}$  cm/s e  $D_{ef} \approx 2 \times 10^{-10}$  cm<sup>2</sup>/s. O modelo foi usado para simular o processo, o qual foi avaliado quanto à viabilidade técnica e econômica por meio de comparações, considerando o tempo de equilíbrio e massa de CA hidrolisada em função da proporção sólido/líquido no reator.

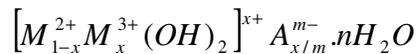
Forte et al. (2012) estudaram a sensibilidade paramétrica, por meio da técnica de planejamento fatorial, do modelo de adsorção de CA na zeólita 13X-Na em sistema batelada, o qual foi avaliado em termos de transporte de massa ( $k_f$  e  $D_{ef}$ ) e de parâmetros hidrodinâmicos tais como: fração de sólidos no reator ( $R_{s/l}$ ), concentração inicial de CA ( $C_0$ ) e diâmetro de partícula ( $d_p$ ). A partir dessa análise, as melhores condições operacionais foram:  $R_{s/l} = 7$  %,  $C_0 = 300$  mg/L e  $d_p = 0,1$  mm, levando a uma redução de 25 min no tempo de equilíbrio de adsorção e apenas 9 % na capacidade de adsorção, aumentando a produtividade do processo.

Silva et al. (2012) estudaram a separação entre CA e aminoácidos usando um sistema integrado de SDFa (PEG e tampão fosfato) seguido de cromatografia de troca iônica com as resinas Amberlite IRA400Cl e Streamline QXL. Após a separação com o SDFa, foi adicionada uma quantidade de etanol à fase de topo (fosfato), contendo principalmente CA e aminoácidos (tirosina, lisina, histidina e prolina), promovendo a precipitação de grande parte dos íons fosfato e dos aminoácidos lisina e histidina. O restante dos contaminantes (fosfato, tirosina e

prolina) foi separado na coluna e a resina mais apropriada foi a QXL com um fator de purificação infinito (ausência de contaminantes), fator de concentração de 2 e degradação de 1 %.

#### 1.5.4 HIDRÓXIDOS DUPLOS LAMELARES (LDH)

Hidróxidos duplos lamelares (LDH) são óxidos e hidróxidos minerais da classe dos não-silicatos (Newman, 1987; Forano et al., 2006). Apresentam algumas propriedades físicas e químicas comparadas às de argilas minerais como estrutura lamelar (empilhamento de camadas), ampla composição química (devido à substituição de cátions metálicos), variação da densidade de cargas nas camadas, propriedades de troca iônica, nanoespaços interlamelares reacionais, intumescência em água, propriedades reológicas e coloidais (Forano et al., 2006). Esse material também é conhecido como “argilas aniônicas” devido a seu potencial de troca aniônica. O domínio interlamelar dos LDH se constitui essencialmente de moléculas de água e ânions, sendo grande o número de espécies aniônicas orgânicas e inorgânicas capazes de ocupar este domínio (Crepaldi e Valim, 1998). Esses compostos podem ser representados pela seguinte fórmula geral:



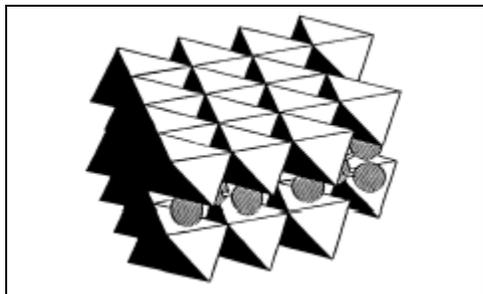
onde:

$M^{2+}$  (ou  $M^{II}$ ) representa um cátion metálico divalente;

$M^{3+}$  (ou  $M^{III}$ ) representa um cátion metálico trivalente;

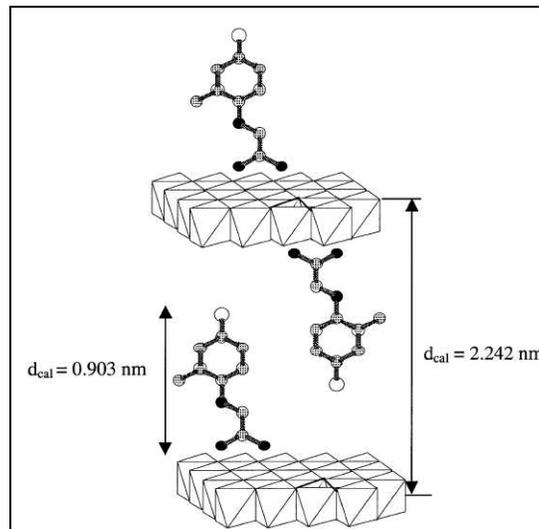
$A^{m-}$  (ou A) representa um ânion intercalado com carga m.

O grupo  $[M_{1-x}^{2+}M_x^{3+}(OH)_2]^{x+}$  refere-se à composição das lamelas e  $[A_{x/m}^{m-}.nH_2O]$  à dos espaços interlamelares (Forano et al., 2006). A estrutura, formada pelo empilhamento de camadas carregadas positivamente com ânions e moléculas de água ocupando o domínio interlamelar (Yang et al., 2005), é comum a todos os LDH. Na Figura 1.6, pode ser visualizado um esquema ilustrativo da estrutura das argilas aniônicas. Os centros dos octaedros são ocupados pelos cátions divalentes e trivalentes, os vértices são ocupados por ânions hidroxila. Conforme ilustrado nas Figuras 1.7 e 1.8, esses espaços podem ser ocupados por moléculas aniônicas de diversos diâmetros.

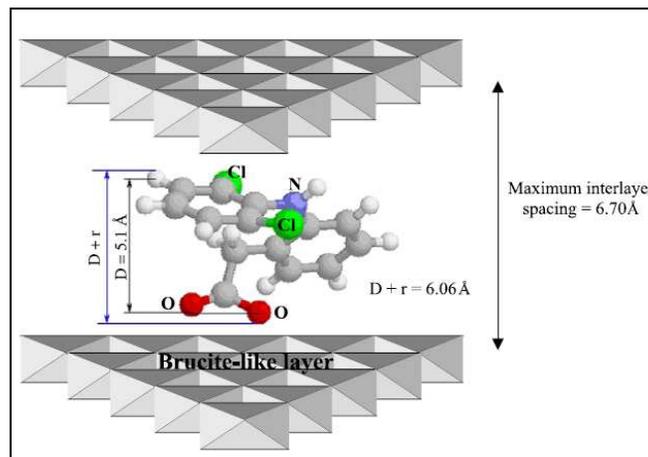


**Figura 1.6:** Esquema tridimensional da estrutura das argilas aniônicas.

Fonte: Crepaldi e Valim (1998).



**Figura 1.7:** Modelo estrutural de interação de um pesticida com hidróxidos duplos lamelares (LDH). Fonte: Inacio et al. (2001).

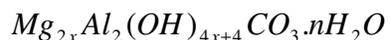


**Figura 1.8:** Modelo proposto de orientação do ácido orgânico diclofenaco no espaço interlamelar do hidróxido duplo lamelar (LDH). Fonte: Dupin et al. (2004).

#### 1.5.4.1 Tipos de hidróxidos duplos lamelares (LDH)

Como a hidrotalcita é o mineral de maior representatividade do grupo, tem-se utilizado outro termo referente a esses materiais: "compostos do tipo hidrotalcita" (do inglês *hydrotalcite-like compounds*) (Forano et al., 2006). A

hidrotalcita é uma argila aniônica natural contendo ânions carbonato intercalados entre lamelas de hidróxido duplo de magnésio e alumínio (Crepaldi e Valim, 1998) e pode ser representada pela fórmula:



Encontra-se na natureza uma série de tipos de LDH com as mais variadas composições e simetrias. Na Tabela 1.1, as composições e nomes dos minerais correspondentes às argilas aniônicas naturais com diferentes simetrias. Em termos quantitativos, essa disponibilidade é considerada limitada. Porém, argilas aniônicas são facilmente sintetizadas a custos relativamente baixos, tanto em escala de laboratório como industrial (Forano et al., 2006; Trifiro e Vaccari, 1996).

**Tabela 1.1:** Composição de algumas argilas naturais com sistema cristalino e grupo espacial.

Composição			Nome do mineral	
M <sup>II</sup>	M <sup>III</sup>	A	Romboédrico	Hexagonal
Mg	Al	CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	Hidrotalcita	Manasseita
Mg	Cr	CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	Estictita	Barbetonita
Mg	Fe	CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	Piroaurita	Esjogrenita
Ca	Al	OH <sup>-</sup>	-	Hidrocalumita
Ni	Al	CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	-	Tacovita
Ni	Fe	CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	Reevesita	-
Ni	Fe	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	Honessita	-

Fonte: Crepaldi e Valim (1998).

#### 1.5.4.2 Síntese de hidróxidos duplos lamelares (LDH)

Vários são os métodos de obtenção de LDH sintéticos, dentre os quais se destaca o método da coprecipitação (ou método sal-base), por ser o mais utilizado na síntese de LDH, e o método da substituição do ânion interlamelar por troca aniônica, por ser bastante aplicável em diversos setores da indústria em processos de adsorção levando em consideração a gama de espécies aniônicas existentes.

A coprecipitação é um método direto que pode ser realizado de duas diferentes formas: a pH variável e a pH constante (Roy et al., 1992). O método de coprecipitação a pH variável consiste na adição de uma solução contendo os sais dos cátions divalente e trivalente sobre uma solução contendo hidróxido e o ânion a ser intercalado (Reichle, 1986). Já o método de coprecipitação a pH constante é realizado com a adição de uma solução contendo sais dos cátions sobre uma solução contendo o ânion a ser intercalado sendo o pH mantido constante pela adição de uma solução alcalina (NaOH ou KOH) (Silvério, 2004).

A estrutura lamelar dos LDH, baseada no empilhamento de camadas positivas, aprisionando espécies aniônicas no domínio interlamelar por atração eletrostática, torna altamente favorável a difusão desses ânions. Essa propriedade é largamente utilizada na preparação de novos LDH, por troca iônica do ânion interlamelar, a partir de um precursor previamente preparado (Roy et al., 1992).

A substituição do ânion interlamelar é um método indireto e pode ser por troca iônica em solução, troca iônica em meio ácido e por regeneração do precursor calcinado. A troca iônica em solução baseia-se na mobilidade do ânion interlamelar através da competição entre o ânion a ser intercalado e o ânion do precursor (intercalado com ânions cloreto ou nitrato) que é suspenso em uma solução concentrada (0,1 M) dos ânions de interesse. Na troca iônica em meio ácido, o

deslocamento do equilíbrio é causado pela reação do ânion interlamelar com o ácido. Para isso, é necessário suspender o LDH precursor e adicionar sobre essa suspensão uma solução do ácido cuja base conjugada deseja-se intercalar (Silvério, 2004).

A intercalação por regeneração do precursor calcinado em presença do ânion a ser intercalado depende da preparação do precursor contendo carbonato e da calcinação do mesmo a uma temperatura adequada. O uso do carbonato se justifica pelo fato de sua decomposição se dar em temperaturas inferiores às de outros ânions além de não haver produção de gases oxidantes com a calcinação, como é o caso do cloreto ou nitrato que produzem  $\text{Cl}_2$  e  $\text{NO}_2$ , respectivamente (Crepaldi e Valim, 1998; Lal e Howe, 1981).

#### **1.5.4.3 Aplicações dos hidróxidos duplos lamelares (LDH)**

Devido a características como ampla área superficial (espaçamento interlamelar), boa estabilidade térmica, facilidade de reciclo (com a regeneração estrutural) e o grande número de ânions hábeis a trocas, esses materiais têm despertado o interesse para aplicações como trocadores iônicos e adsorventes, inclusive em escalas industriais (Yang et al., 2005). Recentemente, têm se tornado cada vez mais frequentes os trabalhos com o uso de LDH na incorporação de ânions orgânicos.

Crepaldi e Valim (1998) citaram dois trabalhos sobre a adsorção de substâncias orgânicas em solução. No primeiro, Cai et al. (1994) trataram da adsorção dos ânions (não protonado e mono protonado) do diácido orgânico 5-benzoil-4-hidroxibenzenosulfônico, utilizando além das isotermas de adsorção a microscopia de força atômica *in situ* para analisar a estrutura do sistema adsorvente-adsorbato através da geração de imagens em nanoescala. No outro,

Hermosín et al. (1994) avaliaram a capacidade da hidrotalcita, sem calcinar e calcinada, em adsorver o 2,4,6-trinitrofenol, formulando um mecanismo para essa adsorção com base nas isotermas de adsorção utilizando como ferramentas analíticas análises por XRD (*X-ray diffraction*) e por FTIR (*Fourier transform infrared*).

Inacio et al. (2001) também avaliaram a adsorção de MCPA por diferentes LDH e observaram que as isotermas de adsorção obedeciam ao modelo de Freundlich conforme duas etapas, uma troca externa seguida por uma troca interlamelar. Observou-se as influências de fatores como pH, razão  $Mg^{2+}/Al^{3+}$ , natureza do ânion interlamelar ( $NO_3^-$ ,  $Cl^-$  e  $CO_3^{2-}$ ) e morfologia do adsorvente. O equilíbrio foi alcançado em menos de 1 hora, houve maior adsorção entre pH 5 - 7 e uma maior afinidade matriz/ânion na ordem  $NO_3^- < Cl^- < CO_3^{2-}$ .

Orthman et al. (2003) reportaram a adsorção de melanodinas, concentrados de açúcares e corantes orgânicos em argilas aniônicas do tipo hidrotalcita verificando um tempo de equilíbrio, descrito pelo modelo de Langmuir, de 1 hora com eficiência na remoção do corante de aproximadamente 99 %. A melhor adsorção do açúcar se deu nas argilas calcinadas e constatou-se a capacidade de adsorção do material reutilizado. Os autores concluíram que esse tipo de argila constitui um promissor material na adsorção de substâncias orgânicas ou biológicas em sistemas aquosos.

Dupin et al. (2004) pesquisaram sobre a intercalação de diclofenaco em hidrotalcitas usando os métodos de troca iônica direta, síntese por coprecipitação e por reconstrução do precursor calcinado, verificando um maior grau de intercalação pelo método de reconstrução, dado pelo aumento do espaço interlamelar.

Cardoso (2006) realizou um estudo sobre a adsorção dos herbicidas orgânicos MCPA (4-cloro-2-metilfenoxiacetato), 2,4-D (2,4-diclorofenoxiacetato) e Picloram (4-amino-3,5,6-tricloropiridina-2-carboxilato), investigando a cinética do processo de sorção e determinação das isothermas em dois pHs. Os herbicidas foram intercalados utilizando o método da regeneração do material calcinado e troca aniônica em solução em hidrotalcitas.

Bonina et al. (2008) compararam a capacidade de retenção do ácido [2-(2,6-dicloro-fenilamino)-fenil]-acético, mais conhecido como diclofenaco, por hidrotalcitas [Mg-Al-CO<sub>3</sub>] sem calcinação e com calcinação e concluíram que o material calcinado demonstrou-se mais favorável para a adsorção. Foram realizados experimentos *in vivo* a fim de testar a eficiência do composto, usando os LDH como suporte, em voluntários humanos e os melhores resultados quanto à atividade foram obtidos usando o LDH sem tratamento térmico.

### 1.5.5 ADSORÇÃO

Sorção é uma das operações unitárias mais usadas na extração e purificação de produtos biotecnológicos. Alguns autores a consideram como o fenômeno que descreve o movimento de um material de uma fase para outra, onde o termo adsorção seria utilizado quando o processo envolve unicamente a superfície. Já quando há distribuição da substância sorvida através da fase, o termo mais correto seria absorção (Kennedy e Cabral, 1993).

Outros autores entendem que a diferença principal reside no fato de que na adsorção há transporte de massa entre um fluido e um sólido quase sempre em estado transiente e na absorção esse movimento se dá entre fluidos em estado estacionário (Cussler, 1997).

Aqui, consideraremos a segunda definição, onde o processo de adsorção caracteriza-se pelo transporte de um soluto (adsorbato) diluído em solução para um sólido (adsorvente). Essa técnica tem recebido atenção especial em bioprocessos uma vez que biomoléculas podem ser adsorvidas seletivamente no interior de uma gama de materiais sólidos possibilitando a utilização dessas propriedades nas etapas de extração da molécula alvo. Basicamente, os adsorventes podem ser divididos em três classes: carvões, materiais inorgânicos e polímeros sintéticos (Cussler, 1997; Ruthven, 1984).

#### **1.5.5.1 Classificação da adsorção**

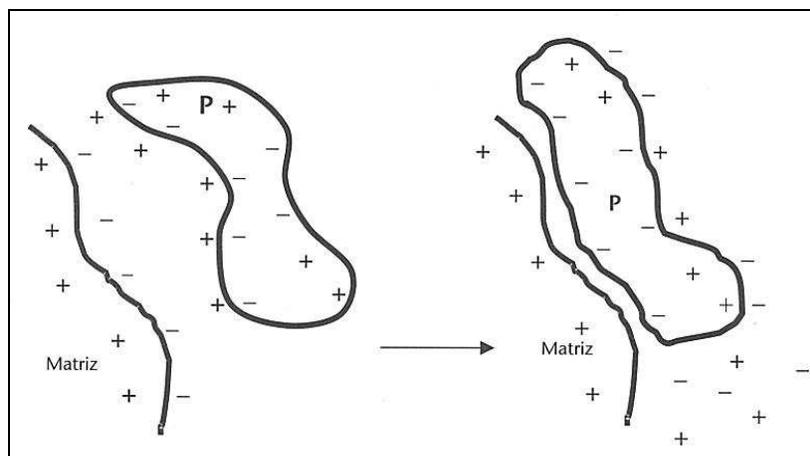
Há basicamente duas maneiras (ou critérios) de classificação da adsorção: quanto à natureza do processo e em relação ao princípio específico da reação.

De uma maneira clássica, o processo de adsorção é dividido, quanto à natureza do processo, em dois tipos: adsorção física e adsorção química. A adsorção física ocorre apenas em função de um campo de forças de natureza física entre o adsorvente e o adsorbato, usualmente denominadas de forças de van der Waals e/ou de interações eletrostáticas (como as de dipolo), que são de intensidade fraca ou moderada. Ela é invariavelmente de natureza exotérmica, não específica, ocorre a baixas temperaturas (requer baixo calor de adsorção), o processo pode ser em mono ou multicamadas, as moléculas adsorvidas não sofrem dissociação, não precisa de ativação, é rápida e o equilíbrio é geralmente fraco e reversível, já que a energia requerida para a dessorção é pequena (Ruthven, 1984).

A adsorção química resulta em uma mudança na forma química do adsorbato, é mais forte que a fisissorção e ocorre liberação de calor semelhante aos valores liberados em uma reação química. Ocorre a altas temperaturas, o calor de adsorção é na ordem de entalpias de reação, é altamente específica, se processa

apenas em monocamadas, pode haver dissociação das moléculas adsorvidas, precisa de ativação e pode ser irreversível (Ruthven, 1984).

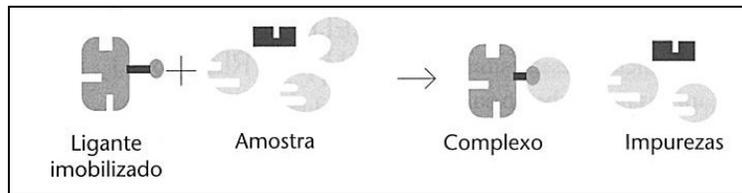
De um ponto de vista mais específico, a adsorção é subdividida em quatro classes: adsorção por troca iônica, afinidade, exclusão de tamanho molecular ou por hidrofobicidade. Na troca iônica (Figura 1.9), a adsorção ocorre de forma reversível entre moléculas de solutos eletricamente carregados e uma matriz sólida altamente carregada com cargas opostas. Os solutos adsorvidos são subsequentemente eluídos após serem trocados por outros íons que possuem o mesmo tipo de carga, porém com maior afinidade com a fase estacionária. São os diferentes graus de afinidade eletrostática entre a fase estacionária e os íons da fase móvel que regem esse tipo de adsorção (Pessoa Jr., 2005).



**Figura 1.9:** Adsorção por troca iônica. Fonte: Pessoa Jr. (2005).

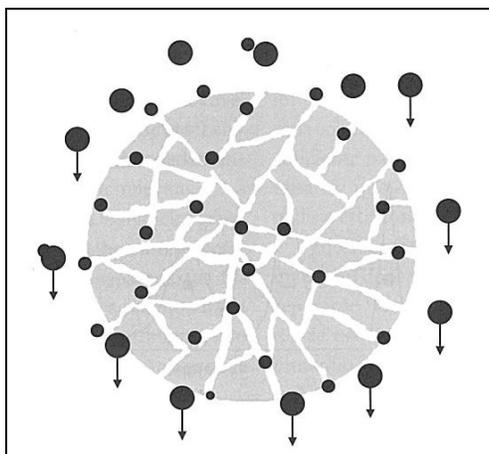
A adsorção por afinidade (Figura 1.10) é baseada principalmente nas propriedades biológicas ou funcionais das espécies que interagem: da molécula a ser adsorvida (adsorbato) e da fase estacionária (adsorvente). Ela depende das interações altamente específicas entre os pares de materiais biológicos: enzima-

substrato, enzima-inibidor, antígeno-anticorpo, etc. Um dos componentes dessa interação (denominado ligante) é imobilizado em um suporte insolúvel (matriz porosa) e outro componente é seletivamente adsorvido neste ligante, previamente imobilizado (Kamimura e Maugeri Filho, 2005).



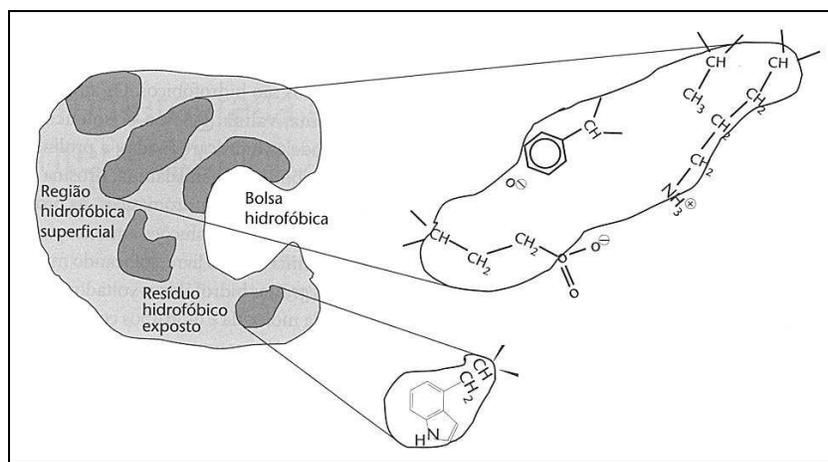
**Figura 1.10:** Adsorção por afinidade. Fonte: Kamimura e Maugeri Filho (2005).

Na adsorção por exclusão de tamanho molecular, ou filtração em gel, permeação em gel, cromatografia em peneira molecular de difusão restrita (Figura 1.11), as moléculas sofrem partição, em virtude das diferenças no tamanho das espécies, entre um solvente (fase móvel) e uma matriz de porosidade definida (fase estacionária), a qual se caracteriza por apresentar uma faixa de fracionamento, o que significa que moléculas nessa faixa de massa molar podem ser separadas (Moraes e Rosa, 2005).



**Figura 1.11:** Adsorção por exclusão de tamanho molecular. Fonte: Moraes e Rosa (2005).

Entende-se por interação hidrofóbica a tendência de grupos alifáticos ou de outras estruturas apolares a se associarem quando presentes em meio aquoso. A adsorção por hidrofobicidade (Figura 1.12) baseia-se na interação hidrofóbica ou na associação entre o adsorbato e ligantes hidrofóbicos imobilizados em um suporte sólido. Esses ligantes são obtidos pela fixação de grupos hidrofóbicos de cadeia curta (butil, octil, fenil) na superfície de um suporte sólido, mediante braços ou espaçadores (Maugeri Filho e Mendieta-Taboada, 2005).

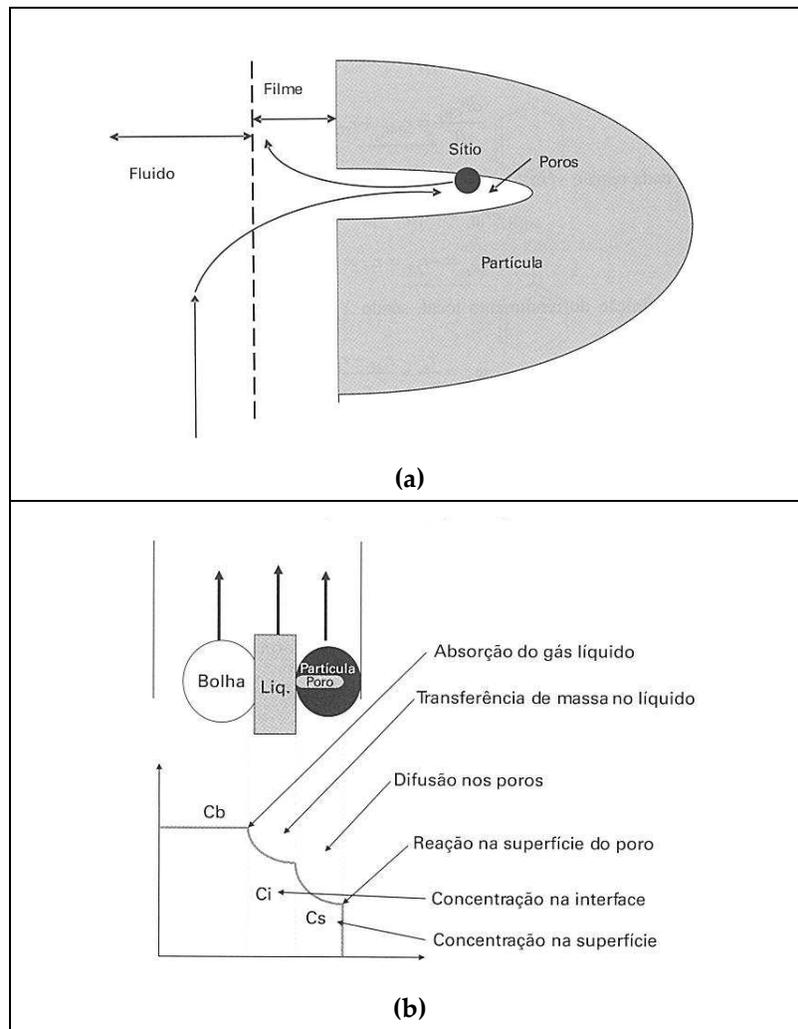


**Figura 1.12:** Adsorção por hidrofobicidade. Fonte: Maugeri Filho e Mendieta-Taboada (2005).

### 1.5.5.2 Transporte de massa na adsorção em partículas sólidas

Quando se trabalha com processos adsorptivos, aspectos cinéticos e termodinâmicos devem ser envolvidos para se conhecer melhor seu desempenho e mecanismos. Normalmente, nos sistemas heterogêneos onde a reação, no caso a adsorção, se processa no interior de partículas sólidas dispersas em um fluido, há problemas de transferência de massa externa (com a formação da película) e de transferência de massa interna (relacionada à difusividade do adsorbato em solução assim como à tortuosidade das partículas do adsorvente). Esse mecanismo pode incluir: difusão molecular da fase líquida para a película formada ao redor da partícula; difusão através do filme até a superfície da partícula; migração dentro do adsorvente por difusão nos poros; captura do adsorbato que pode ser por quimissorção, fisissorção, troca iônica ou complexação (Khraisheh et al., 2002). Esses fenômenos podem ser visualizados na Figura 1.13.

Os parâmetros de transporte, coeficiente de transferência de massa na película ( $k_f$ ) e difusividade efetiva ( $D_{ef}$ ) estão relacionados com cada tipo de sistema adsorvente/adsorbato e dependem diretamente do tipo de interação entre esses elementos assim como o perfil cinético e hidrodinâmico do processo.



**Figura 1.13:** Transporte de massa do adsorbato do meio líquido para o interior da partícula do adsorvente: (a) efeito de difusão intraparticular; (b) perfis de concentração ao longo do sistema.

Fonte: Scmal (2010).

Dessa forma, cada sistema pode ser caracterizado diferentemente em relação a esses parâmetros. Barboza et al. (2002a) e Barboza et al. (2003) estudaram a adsorção de CA em resinas de troca iônica IRA 400 e observaram valores de  $k_f$  e  $D_{ef}$  na ordem de grandeza de  $10^{-2}$  cm/s e  $10^{-5}$  cm<sup>2</sup>/s, respectivamente. Sulak et al. (2007) estudaram a adsorção do corante *astrazon yellow* por adsorção em farelo de trigo e estimaram valores de  $k_f$  e  $D_{ef}$  na ordem de grandeza de  $10^{-5}$  cm/s e  $10^{-11}$

cm<sup>2</sup>/s, respectivamente. Sonetaka et al. (2009b) constataram valores de  $k_f$  variando de 10<sup>-5</sup> a 10<sup>-2</sup> cm/s e de  $D_{ef}$  variando de 10<sup>-10</sup> a 10<sup>-7</sup> cm<sup>2</sup>/s para a adsorção de fenol em carvão ativo. Todos esses estudos usaram sistemas de adsorção em reator do tipo batelada.

Uma maneira rápida e suficientemente eficaz no direcionamento acerca das resistências controladoras do processo é a análise de números adimensionais. O número de Biot mássico ( $Bi$ ), também conhecido como gradiente adimensional de concentração no filme e que relaciona o coeficiente de transferência de massa no filme ( $k_f$ ) e a difusividade efetiva do adsorbato ( $D_{ef}$ ) na partícula do adsorvente de raio  $R_p$ , e o módulo de Thiele aparente ( $\phi^{ap}$ ) estão definidos nas equações 1.3 e 1.4. A razão do módulo de Thiele ser chamado de aparente reside no fato desse parâmetro ter sido calculado a partir de dados experimentais e não a partir de constantes cinéticas intrínsecas.

$$Bi = \frac{k_f R_p}{D_{ef}} \quad (1.3)$$

$$\phi^{ap} = \frac{R_p^2}{9} \frac{v_{obs}}{D_{ef} C_0} \quad (1.4)$$

onde,

$$v_{obs} = \frac{\Delta C}{\Delta t} \quad (1.5)$$

Esse tipo de abordagem tem sido frequentemente encontrado na literatura específica sobre adsorção (Sonetaka et al., 2009a; Sonetaka et al., 2009b; Sulak et al., 2007; Barboza et al., 2003; Barboza et al., 2002a; Khraisheh et al., 2002; Guibal et al., 1998). Alguns processos de sorção são controlados pelo transporte de massa

externo, outros pela difusividade intraparticular, porém, muitas vezes ambos os mecanismos são limitantes.

Usualmente  $\phi^{ap} < 0,3$  indica limitação pela etapa de adsorção (difusão intraparticular) e  $\phi^{ap} > 3,0$  pela transferência de massa externa (Barboza et al., 2002a).

Sonetaka et al. (2009a) obtiveram curvas de adsorção de fenol em carvão ativo e propuseram um método para determinação simultânea de  $k_f$  e  $D_{ef}$ . Os autores concluíram que no sistema estudado  $Bi < 0,5$  e  $Bi > 200$  são áreas limitadas por transferência de massa externa e por difusão intraparticular, respectivamente. Na faixa  $0,5 < Bi < 200$  ambos os mecanismos são controladores da adsorção em questão.

Sulak et al. (2007), investigando a remoção de um corante (*astrazon yellow*) por adsorção em farelo de trigo usando sistema de batelada, verificaram que a taxa de remoção foi dependente tanto da transferência de massa externa como da difusão intraparticular e que os baixos valores de  $D_{ef}$ ,  $10^{-11}$  cm<sup>2</sup>/s, e consequentemente altos valores de  $Bi$  ( $> 100$ ), indicaram a influência da difusão intraparticular como dominante no controle da cinética. Khraisheh et al. (2002) elucidaram as etapas limitantes no processo de adsorção, em carvão ativo de um corante reativo em batelada. Os autores também encontraram altos valores para o transporte de massa externo ( $k_f \approx 10^{-2}$  cm/s) frente ao interno ( $D_{ef} \approx 10^{-7}$  cm<sup>2</sup>/s) e consequentemente altos valores para  $Bi$  ( $>100$ ), concluindo que o processo como um todo foi controlado pela difusão intraparticular, apesar de comentar que o comportamento cinético lento sugere um processo controlado tanto pelo transporte externo como pelo interno.

No entanto, ambos os trabalhos (Sulak et al., 2007; Khraisheh et al., 2002) consideraram que no início do processo (primeiros 30 min), nesse caso específico, haveria um controle principalmente por transferência de massa externa, facilitando, dessa maneira, a resolução do modelo. Porém, em bioprocessos, nem sempre é possível ou conveniente a realização laboriosa de um grande número de experimentos e as considerações são na maioria das vezes particulares. Por esta razão, é importante o desenvolvimento da etapa de modelagem matemática do sistema com a estimação e otimização dos parâmetros do processo.

### 1.5.5.3 Cinética de adsorção

Além da capacidade de adsorção, o desempenho cinético de um dado adsorvente é também de grande importância para aplicações em escala piloto. A partir de uma análise cinética, a taxa de captura do soluto, a qual determina o tempo de residência necessário para que a reação se complete, pode ser estabelecida. Ainda, o conhecimento do mecanismo cinético contribui com informações de grande valia para o planejamento e dimensionamento de equipamentos na etapa de *scale-up*. Existem vários modelos na literatura para explicar a cinética do processo de adsorção, dos quais alguns são relatados a seguir:

#### *a) Modelos de reações controladas pela taxa de reação*

- Modelo cinético de pseudoprimeira ordem

Segundo Qiu et al. (2009), Lagergren apresentou esse modelo em 1898 para descrever a cinética de adsorção líquido-sólido de ácido oxálico e malônico em carvão, o qual acredita-se ser o modelo mais antigo sobre adsorção baseado na capacidade de adsorção, conforme a seguinte equação:

$$\frac{dq}{dt} = k_{cin} (q^* - q) \quad (1.6)$$

onde  $q^*$  e  $q$  são as quantidades de adsorbato adsorvida no equilíbrio e em um tempo  $t$  (min), respectivamente, expressas em massa de adsorbato por massa de adsorvente (mg/g), e  $k_{cin}$  é a constante cinética do modelo de pseudoprimeira ordem ( $\text{min}^{-1}$ ).

- Modelo cinético de pseudossegunda ordem

Ho e Mckay (1998) descreveram a cinética de um processo de adsorção de íons de metais divalentes em turfa pela ligação química entre os íons metálicos divalentes e os grupos funcionais polares da turfa, tais como aldeídos, cetonas, ácidos e fenóis, que são os responsáveis pela capacidade de troca de cátions desse material vegetal. O modelo apresentado pelos autores, denominado de modelo de pseudossegunda ordem, foi o seguinte:

$$\frac{dq}{dt} = k_{cin,2} (q^* - q)^2 \quad (1.7)$$

onde  $q$  é a quantidade de adsorbato adsorvida em um tempo  $t$  e  $k_{cin,2}$  é a constante cinética do modelo de pseudossegunda ordem. Toda a modelagem teórica foi mais bem detalhada pelos autores.

- Equação de Elovich

A equação cinética de quimissorção foi estabelecida por Zeldowitsch (1934) e foi usada para descrever a taxa de adsorção de monóxido de carbono em dióxido de manganês, que decresce exponencialmente com o decréscimo na quantidade de gás adsorvido (Qiu et al., 2009):

$$\frac{dq}{dt} = k_{elov} e^{-\alpha_{elov} q} \quad (1.8)$$

onde  $q$  é a quantidade de adsorbato adsorvida em um tempo  $t$ ,  $k_{elov}$  é a constante de dessorção do modelo de Elovich e  $\alpha_{elov}$  é a taxa inicial de adsorção.

- Modelo cinético de segunda ordem

Primeiramente, esse modelo foi muito usado para descrever reações que ocorrem no solo e em minerais do solo. Recentemente, tem sido usado para descrever adsorção de flúor em argilas (Qiu et al., 2009). Esse modelo segue a seguinte equação:

$$\frac{dC}{dt} = -k_{sec} C^2 \quad (1.9)$$

**b) Modelos de reações controladas por difusão**

- Lei da força motriz linear

Em sistemas de adsorção líquido/sólido a taxa de acúmulo de adsorbato na fase sólida é igual àquela da transferência de soluto pelo filme líquido segundo o balanço de massa. A taxa de acúmulo de soluto na fase sólida é igual a  $V_p \left( \frac{\partial \bar{q}}{\partial t} \right)$ , onde  $\bar{q}$  representa a concentração média do soluto no sólido e  $V_p$  o volume da partícula. A taxa de transferência de soluto através da película de líquido é proporcional à área da superfície da partícula ( $A_s$ ) e à diferença de concentrações ( $C - C_s$ ), sendo  $C$  e  $C_s$  as concentrações na fase líquida e na superfície da partícula, respectivamente, de onde se obtém a seguinte equação, na qual  $k_f$  é o coeficiente de transferência de massa na película externa à partícula (Cooney, 1999):

$$\frac{\partial \bar{q}}{\partial t} = k_f \frac{A_s}{V_p} (C - C_s) \quad (1.10)$$

- Equação de transferência de massa por difusão no filme

Esse modelo foi apresentado por Boyd et al. (1947) e corresponde a seguinte equação:

$$\ln\left(1 - \frac{q}{q^*}\right) = R^I t \quad (1.11)$$

$$R^I = \frac{3 D_e^I}{r_0 \Delta r_0 K^I} \quad (1.12)$$

onde  $R^I$  ( $\text{min}^{-1}$ ) é a constante de difusão no filme,  $D_e^I$  ( $\text{cm}^2/\text{min}$ ) é o coeficiente de difusão efetiva no filme,  $r_0$  (cm) é o raio da partícula,  $\Delta r_0$  (cm) é a espessura do filme, e  $K^I$  é a constante de equilíbrio de adsorção. Se a difusão no filme é a etapa limitante do processo, esse modelo corresponde a uma reta e o parâmetro  $R^I$  pode ser obtido facilmente por meio de um ajuste linear (Qiu et al., 2009).

- Difusão intraparticular em sólido homogêneo

O modelo conhecido como HSDM (*homogeneous solid diffusion model*) considera a partícula como uma esfera homogênea e amorfa (Cooney, 1999):

$$\frac{\partial q}{\partial t} = \frac{D_{ef}}{r^2} \frac{\partial}{\partial r} \left( r^2 \frac{\partial q}{\partial t} \right) \quad (1.13)$$

onde  $q$  (mg/g) é a quantidade de adsorbato adsorvida no sólido variando com o raio em um tempo  $t$  (min),  $D_{ef}$  ( $\text{cm}^2/\text{min}$ ) é a difusividade efetiva intraparticular,  $r$  (cm) representa a posição radial.

#### 1.5.5.4 Equilíbrio de adsorção

Os modelos comumente citados na literatura são o linear, de Langmuir e de Freundlich (Almeida Neto, 2011; Chang et al., 2006; Almeida, 2003; Mayer e

Deckwer, 1996b; Gosling et al., 1989; Belter et al., 1988). A equação 1.14 representa o modelo linear.

$$q^* = k_{lin} C^* \quad (1.14)$$

onde  $q^*$  é a quantidade de adsorbato adsorvida no equilíbrio,  $k_{lin}$  é o coeficiente do modelo de equilíbrio linear (ou constante de adsorção),  $C^*$  é a concentração no equilíbrio do adsorbato em solução. Essa relação linear ocorre geralmente em baixas concentrações e é também conhecida como lei de Henry (Almeida Neto, 2011).

Segundo Ciola (1981), citado por Claudino (2003), a isoterma de Langmuir é válida para adsorção em monocamada na superfície contendo um número finito de sítios. O modelo dessa isoterma segue a hipótese de que as moléculas são adsorvidas e aderem na superfície do adsorvente em sítios ativos definidos e localizados. Cada um destes sítios ativos pode acomodar uma monocamada e a energia de adsorção de cada espécie adsorvida é a mesma em todos os sítios da superfície. A equação 1.15 descreve a isoterma de Langmuir.

$$q^* = \frac{q_m C^*}{k_d + C^*} \quad (1.15)$$

onde  $q_m$  é a capacidade máxima de adsorção e  $k_d$  é a constante de dissociação (ou de dessorção).

Mayer e Deckwer (1996b) afirmaram que, para concentrações muito baixas ou em sistemas onde a fase estacionária apresenta baixa afinidade pelo adsorbato ( $k_d \gg C^*$ ), essa equação pode ser simplificada para o modelo linear. Esses autores notaram ainda que, em casos específicos, uma alternativa para modelagem de dados experimentais seria a adição de um termo ao modelo Langmuir, denominando-se de modelo de Langmuir duplo (equação 1.16). Esse tipo de

modelo é utilizado quando dois tipos distintos de interação ocorre entre o adsorbato e a superfície ativa do adsorvente (Almeida, 2003), como por exemplo na ausência ou presença de alguma substância competidora no processo de adsorção (Mayer e Deckwer, 1996b).

$$q^* = \frac{q_{m,1} C^*}{k_{d,1} + C^*} + \frac{q_{m,2} C^*}{k_{d,2} + C^*} \quad (1.16)$$

A isoterma de Freundlich (equação 1.17) é utilizada para energias superficiais heterogêneas. Descreve a adsorção de uma grande variedade de antibióticos, esteróides e hormônios (Belter et al., 1988), no entanto só é válida para soluções diluídas e não prediz a linearidade quando a concentração tende a zero. É um dos modelos mais usados, devido à sua simplicidade.

$$q^* = k_F (C^*)^{n_F} \quad (1.17)$$

onde  $k_F$  é a constante do modelo Freundlich,  $n_F$  é o índice do modelo Freundlich.

A equação BET de Brunauer-Emmet-Teller (equação 1.18) foi desenvolvida com o objetivo de relacionar valores obtidos a partir das isotermas de adsorção com a área específica de um sólido. Para tal, é obtido o volume da monocamada ( $V_m$ ) através do volume de gás adsorvido ( $V$ ) a uma determinada pressão e a área ( $S_{BET}$ ) pode então ser calculada. Todo o tratamento matemático leva em consideração a formação de multicamadas, mas é necessário observar que a equação 1.18 não é válida em toda a faixa de valores de pressão. A relação linear só é obedecida, para a maioria dos sistemas adsorvente/adsorbato, na faixa de valores de pressão relativa entre 0,05 e 0,35 (Claudino, 2003).

$$\frac{1}{V \left( \frac{P_0}{P} - 1 \right)} = \frac{1}{V_m C_{BET}} + \left( \frac{C_{BET} - 1}{V_m C_{BET}} \right) \frac{P}{P_0} \quad (1.18)$$

$$s = \frac{1}{V_m C_{BET}} \quad (1.19)$$

$$i_{BET} = \frac{C_{BET} - 1}{V_m C_{BET}} \quad (1.20)$$

$$V_m = \frac{1}{s + i_{BET}} \quad (1.21)$$

$$S_{BET} = \frac{V_m N}{22,414} \quad (1.22)$$

onde V é o volume de gás adsorvido a pressão P,  $V_m$  o volume de gás requerido para formar a monocamada,  $P/P_0$  a pressão relativa do adsorbato,  $C_{BET}$  a constante de adsorção (relacionada com a entalpia de adsorção), N o número de Avogadro e  $S_{BET}$  a área BET.

### 1.5.6 REATORES USADOS EM PROCESSOS ADSORTIVOS

Os reatores convencionais são do tipo descontínuo (batelada ou semicontínuos) e contínuos (tubular ou tanque), sendo o primeiro tipo aplicado a processos em pequena escala e os do segundo tipo aplicados em processos em escalas de grande porte de produção.

O reator batelada é vantajoso para processos em escala pequena, como produção de remédios e química fina. É muito útil para estudar a cinética do processo, podendo-se variar diversos parâmetros para estudar a cinética de reação. No entanto, deve ser construído de maneira a se evitar caminhos preferenciais, com sistema de agitação bastante eficiente para garantir a homogeneidade da mistura. Amostragens intermitentes ao longo do processo são possíveis, determinando-se concentrações intermediárias ou no final da reação. As

desvantagens são dependentes da escala, o reator deve ser carregado e descarregado, e limpo, resultando em um tempo às vezes muito maior do que o da própria reação (Schmal, 2010; Belter et al., 1988).

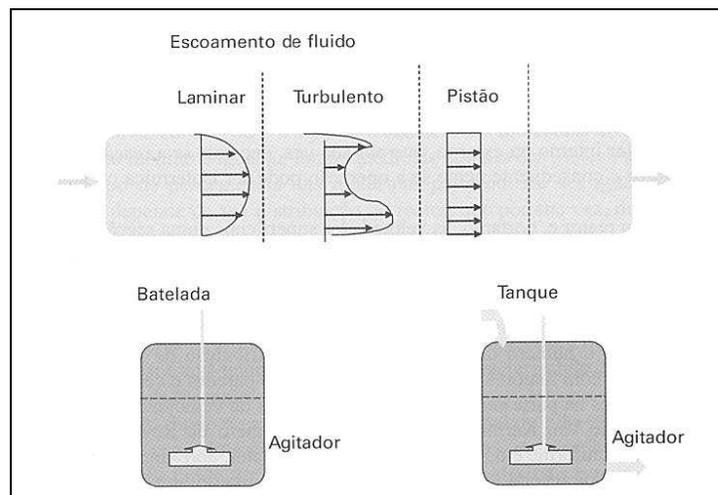
Os reatores contínuos são os mais usados industrialmente em grandes escalas e em todos os tipos de processos industriais. Podem ser empregados processos homogêneos e heterogêneos e podem operar durante vários meses ou anos com paradas intermediárias, produzindo grandes quantidades de produtos. As condições operacionais são amplas, mas exigem um controle contínuo e conseqüentemente mão de obra qualificada (Schmal, 2010).

Outra classificação importante em relação a reatores é quanto à geometria do equipamento, cujas configurações estão ilustradas na Figura 1.14. Schmal (2010) classificou os reatores como sendo:

- Reator tubular: o tempo de contato é igual para todas as moléculas ou elementos do fluido ao longo do reator quando a velocidade for uniforme na seção transversal do tubo, satisfazendo assim o escoamento empistonado, ou seja, os elementos do fluido movem-se em paralelo ao eixo do tubo. Todas as moléculas têm a mesma velocidade. Logo, a concentração é uniforme na seção transversal do tubo e varia somente ao longo do reator. No caso isotérmico, a temperatura permanece constante e não há variação de temperatura na direção radial ou longitudinal. No caso não isotérmico, a temperatura varia ao longo do reator.
- Reator tanque: as moléculas devem ter o mesmo tempo de residência médio no tanque e, portanto, a concentração no tanque deve ser igual à mesma na saída do reator. Isso implica que a mistura deve ser uniforme. Em uma mistura perfeita os volumes mortos devem ser evitados, para que o tempo de residência

médio seja uniforme. Operando nessas condições, esse reator será chamado de CSTR ideal (*continuous stirred tank reactor*).

- Reator batelada: deve ser de mistura perfeita com concentração homogênea no seu volume. Deve ser bem agitado e não deve possuir volumes mortos nos cantos ou nas periferias. A temperatura deve ser mantida uniforme.

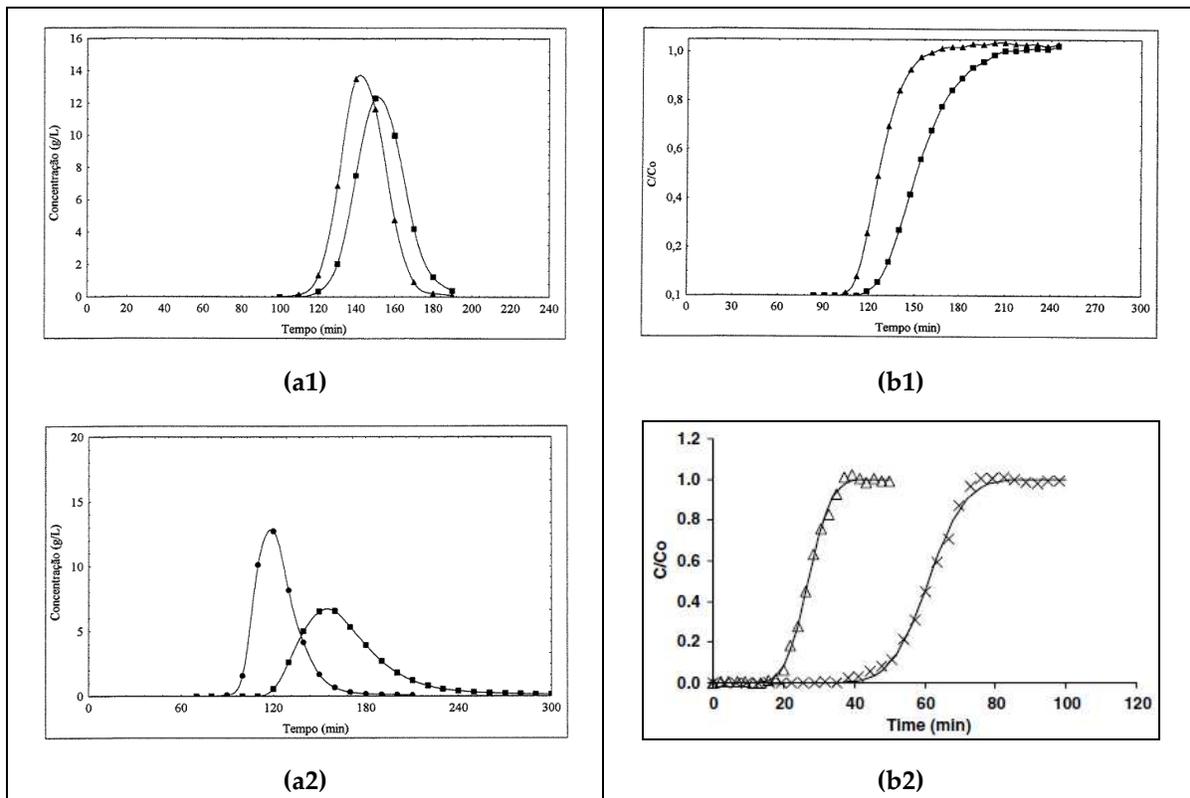


**Figura 1.14:** Reatores do tipo tubular, batelada e tanque. Fonte: Scmal (2010).

Em processos de adsorção, é convencional se fazer estudos cinéticos e de equilíbrio de adsorção em escalas menores, ou seja, em reatores de mistura em batelada. Com as informações sobre os parâmetros cinéticos, de equilíbrio, termodinâmicos e de transporte, o pesquisador ou analista tem condições de prever o comportamento em escalas maiores e planejar a estratégia mais adequada. Essa prática pode reduzir significativamente o gasto pessoal, material e de tempo levando a conclusões mais precisas e com resultados mais vantajosos.

### 1.5.6.1 Colunas de leito fixo

Colunas de leito fixo são reatores do tipo tubular. Em processos de adsorção, a solução contendo o adsorbato pode ser alimentada por meio de duas metodologias: pulso cromatográfico e obtenção de curvas de ruptura (Figura 1.15).



**Figura 1.15:** Exemplos de respostas em colunas adsorptivas de leito fixo: (a) pulso cromatográfico e (b) curvas de ruptura. Fonte: Burkert (2003); Guillemot et al. (2008).

No pulso cromatográfico, um pulso de volume conhecido da mistura ( $v_i$ ) é injetado através da passagem contínua (ascendente ou descendente) de uma fase móvel previamente definida, com vazão controlada ( $Q$ ), que passa pela coluna encamisada, onde a temperatura também é controlada ( $T$ ), com o adsorvente empacotado. As amostras são coletadas na saída da coluna em intervalos de

tempos definidos. Através da análise das frações coletadas, é possível a determinação dos tempos de retenção dos componentes, bem como eficiências de separação (ES) e fatores de purificação (PF).

Na obtenção de curvas de ruptura, o estímulo é realizado por meio de um degrau, ou seja, a mistura passa a ser alimentada continuamente com vazão controlada (Q) até a saturação da coluna. Amostras são coletadas na saída da coluna em intervalos de tempo definidos e as concentrações dos componentes são determinadas. Os tempos de ruptura e de exaustão, assim como as eficiências de recuperação do soluto e de utilização da coluna e a produtividade podem então ser calculadas através de correlações. Exemplos de respostas para cada tipo de alimentação estão ilustrados na Figura 1.15. Esses perfis ilustram duas situações para cada tipo de alimentação: nos exemplos (a1) e (b1) são apresentadas situações (para pulso e curva de ruptura, respectivamente) onde há uma separação menos pronunciada entre as espécies; já nos exemplos (a2) e (b2), um efeito mais representativo de separação entre os componentes (para pulso e curva de ruptura, respectivamente) pode ser observado. Em cada um dos casos, essas separações podem ser quantificadas e avaliadas por comparação entre os tempos de retenção (no caso de pulso) e entre os respectivos tempos de ruptura e de exaustão (no caso de curvas de ruptura) para cada componente.

## 1.6 LITERATURA CITADA

ALMEIDA, R. M. R. G. **Estudo da purificação do ácido clavulânico utilizando processo contínuo de adsorção.** 2003. 170 p. Tese (Doutor em Engenharia Química) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2003.

ALMEIDA, R. M. R. G.; BARBOZA, M.; HOKKA, C. O. Continuous clavulanic acid adsorption process. **Appl. Biochem. Biotech.**, v. 105-108, p. 867-879, 2003.

ALMEIDA NETO, A. F. **Caracterização e avaliação de argilas como adsorventes na remoção e eluição de íons cobre e mercúrio em diferentes sistemas.** 2011. 145 p. Tese (Doutor em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2011.

BAGGALEY, K. H.; BROWN, A. G.; SCHOFIELD, C. J. Chemistry and biosynthesis of clavulanic acid and other clavams. **Nat. Prod. Rep.**, v. 14, p. 309-333, 1997.

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. **Biochem. Eng. J.**, v. 14, p. 19-26, 2003.

BARBOZA, M.; ALMEIDA, R. M. R. G.; HOKKA, C. O. Intrinsic kinetic parameters of clavulanic acid adsorption by ion-exchange chromatography. **Ind. Eng. Chem. Res.**, v. 41, p. 5789-5793, 2002a.

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, 2002b.

- BELTER, P. A.; CUSSLER, E. L.; HU, W. S. **Bioseparations: downstream processing for biotechnology**. New York: J. Wiley, 1988.
- BERSANETTI, P. A.; ALMEIDA, R. M. R. G.; BARBOZA, M.; ARAUJO, M. L. G. C.; HOKKA, C. O. Kinetics studies on clavulanic acid degradation. **Biochem. Eng. J.**, v. 23, p. 31-36, 2005.
- BERSANETTI, P. A. **Estudos de adsorção do ácido clavulânico**. 2001. 83 p. Dissertação (Mestre em Biotecnologia) – Instituto de Química de Araraquara, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araraquara, 2001.
- BERSANETTI, P. A.; BARBOZA, M.; HOKKA, C. O.; ARAUJO, M. L. G. C. Estudos cinéticos de hidrólise de ácido clavulânico. In: SINAFERM (Simpósio Nacional de Fermentações), 13., 2000, Teresópolis. **Anais**. Rio de Janeiro: 2000. p. 39.1-39.6.
- BJURSTROM, E. Biotechnology fermentation and downstream processing. **Chem. Eng.**, v. 92, p. 126-158, 1985.
- BONINA, F. P.; GIANNOSI, M. L.; MEDICI, L.; PUGLIA, C.; SUMMA, V.; TATEO, F. Diclofenac-hydrotalcite: In vitro and in vivo release experiments. **Appl. Clay Sci.**, v. 41, p. 165-171, 2008.
- BOON, M. A.; VAN'T RIET, K.; JANSSEN, A. E. M. Enzymatic synthesis of oligosaccharides: product removal during a kinetically controlled reaction. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 70, p. 411-420, 2000.
- BOYD, G. E.; ADAMSON, A. W.; MYERS, L. S. The Exchange Adsorption of Ions from Aqueous Solutions by Organic Zeolites (2). **J. Am. Chem. Soc.**, v. 69, p. 2836-2848, 1947.

BRETHAUER, S.; HELD, M.; PANKE, S. High Concentrations of Clavulanic Acid But Not of Its Degradation Products Decrease Glycerol Consumption and Oxygen Uptake Rates in cultures of *Streptomyces clavuligerus*. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 100, p. 439-447, 2008.

BRITES ALVES, A. M.; MORÃO, A.; CARDOSO, J. P. Isolation of antibiotics from industrial fermentation broths using membrane technology. **Desalination**, v. 148, p. 181-186, 2002.

BROWN, A. G.; BUTTERWORTH, D.; COLE, M.; HANSCOMB, G.; HOOD, J. D.; READING, C.; ROLINSON, G. N. Naturally occurring  $\beta$ -lactam inhibitors with antibacterial activity. **J. Antibiot.**, v. 29, p. 668-669, 1976.

BRYSON, H. M.; BROGDEN, R. N. Piperacillin/tazobactam. a review of its antibacterial activity, pharmacokinetic properties and therapeutic potential. **Drugs**, v. 47, p. 506-535, 1994.

BURKERT, C. A. V. **Separação de glicose, frutose, oligossacarídeos e dextranas utilizando zeólitas**. 2003. 159 p. Tese (Doutor em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.

BUTTERWORTH, D. Clavulanic acid: Properties, Biosynthesis and Fermentation. In: VANDAMME, E. J. **Biotechnology of Industrial Antibiotics**. New York: Marcel Dekker, Inc., 1984. p. 225-235.

BUYNAK, J. D. Understanding the longevity of the  $\beta$ -lactam antibiotics and of antibiotic/  $\beta$ -lactamase inhibitor combinations. **Biochem. Pharmacol.**, v. 71, p. 930-940, 2006.

CAI, H.; HILLIER, A. C.; FRANKLIN, K. R.; NUNN, C. C.; WARD, M. D. Nanoscale imaging of molecular adsorption. **Science**, v. 266, p. 1551-1555, 1994.

CARDOSO, L. P. **Estudo da aplicação de hidróxidos duplos lamelares na remoção e liberação lenta de pesticidas**. 2006. 162 p. Tese (Doutor em Ciências) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2006.

CHANG, Y. K.; HUANG, R. Z.; LIN, S. Y.; CHIU, S. J.; TSAI, J. C. Equilibrium study of immobilized lysozyme on the extrudate-shaped NaY zeolite. **Biochem. Eng. J.**, v. 28, p. 1-9, 2006.

CHARNAS, R. L.; FISHER, J.; KNOWLES, J. R. Chemical studies on the inactivation of *Escherichia coli* RTEM  $\beta$ -lactamase by clavulanic acid. **Biochemistry**, v. 17, p. 2185-2189, 1978.

CHOY, J.-H.; KWAK, S. Y.; PARK, J. S.; JEONG, Y. J.; PORTIER, J. Intercalative Nanohybrids of Nucleoside Monophosphates and DNA in Layered Metal Hydroxide. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 121, p. 1399-1400, 1999.

CIOLA, R. **Fundamentos da Catálise**. São Paulo: Editora da USP, 1981.

CLAUDINO, A. **Preparação de carvão ativado a partir de turfa e sua utilização na remoção de poluentes**. 2003. 90 p. Dissertação (Mestre em Engenharia Química) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2003.

COONEY, D. O. **Adsorption design for wastewater treatment**. Boca Raton: Lewis Publishers, 1999.

CREPALDI, E. L.; VALIM, J. B. Hidróxidos duplos lamelares: síntese, estrutura, propriedades e aplicações. **Quím. Nova**, v. 21, p. 300-311, 1998.

CUEL, M.; BARBOZA, M.; HOKKA, C.; KWONG, W. Heterogeneous Model of the Process of Clavulanic Acid Purification by Ionic Exchange in a Fixed-Bed Column. **Chem. Prod. Proc. Model.**, v. 6, article 1, p. 1-18, 2011.

CUSSLER, E. L. **Diffusion: Mass Transfer in Fluid Systems**. 2. ed. New York: Cambridge University Press, 1997.

DRAWZ, S. M.; BONOMO, R. A. Three Decades of beta-Lactamase Inhibitors. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 23, p. 160-201, 2010.

DUPIN, J.-C.; MARTINEZ, H.; GUIMON, C.; DUMITRIU, E.; FECHETE, I. Intercalation compounds of Mg–Al layered double hydroxides with dichlophenac: different methods of preparation and physico-chemical characterization. **Appl. Clay Sci.**, v. 27, p. 95-106, 2004.

ELANDER, R. P. Industrial production of  $\beta$ -lactam antibiotics. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 61, p. 385-392, 2003.

ENDIMIANI, A.; HUJER, K. M.; HUJER, A. M.; PULSE, M. E; WEISS, W. J.; BONOMO, R. A. Evaluation of Ceftazidime and NXL104 in Two Murine Models of Infection Due to KPC-Producing *Klebsiella pneumoniae*. **J. Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 55, p. 82-85, 2011.

FAN, M.; HUANG, C. P.; HATTON, T. A.; BLAND, A. E.; JUDKINS, R. R.; WANG, Z. L. Application of nanotechnologies in separation and purification. **Sep. Purif. Technol.**, v. 58, p. 1, 2007.

FORANO, C.; HIBINO, T.; LEROUX, K.; TAVIOT-GUÉHO, C. Layered Double Hydroxides. In: BERGAYA, F.; THENG, B. K. G.; LAGALY, G. **Handbook of Clay Science**, Amsterdam: Elsevier, 2006, p. 1021-1095.

FORTE, M. B. S. **Purificação de ácido clavulânico utilizando zeólitas**. 2008. 90 p. Dissertação (Mestre em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2008.

FORTE, M. B. S.; COSTA, F. A. A.; MAUGERI FILHO, F.; RODRIGUES, M. I. Otimização de parâmetros operacionais de sistema cromatográfico para separação de ácido clavulânico produzido em processo fermentativo. In: SINAFERM (Simpósio Nacional de Fermentações), 17., 2009a, Natal. **Anais**.

FORTE, M. B. S.; COSTA, F. A. A.; MAUGERI FILHO, F.; RODRIGUES, M. I. Clavulanic acid separation by molecular sieving from fermentation broth of *Streptomyces clavuligerus* using experimental design. **New Biotech.**, v. 25S, p. S182, 2009b.

FORTE, M. B. S.; RODRIGUES, M. I.; MAUGERI FILHO, F. Clavulanic acid adsorption studies in zeolites. **Adsorpt. Sci. Technol.**, v. 29, p. 391-404, 2011a.

FORTE, M. B. S.; MAZUTTI, M. A.; MAUGERI FILHO, F. RODRIGUES, M. I. Evaluation of kinetic and mass transfer parameters for adsorption of clavulanic acid into natural and synthetic zeolites. **Biotechnol. Bioproc. E.**, v. 16, p. 1223-1230, 2011b.

- FORTE, M. B. S.; MAZUTTI, M. A.; MAUGERI FILHO, F. RODRIGUES, M. I. Comparative studies on parametric sensitivity analyses using conventional and factorial design methodologies: mathematical modelling of clavulanic acid adsorption on zeolites. **J. Chem. Technol. Biotechnol.**, v. 87, p. 1715–1722, 2012.
- GOSLING, I. S.; COOK, D.; FRY, M. D. M. The role of adsorption isotherms in the design of chromatographic separations for downstream processing. **Chem. Eng. Res. Des.**, v. 67, p. 232-242, 1989.
- GUIBAL, E.; MILOT, C.; TOBIN, J.M. Metal-Anion Sorption by Chitosan Beads: Equilibrium and Kinetic Studies. **Ind. Eng. Chem. Res.**, v. 37, p. 1454-1463, 1998.
- GUILLEMOT, M.; MIJOIN, J.; MIGNARD, S.; MAGNOUX, P. Adsorption of tetrachloroethylene (PCE) in gas phase on zeolites of faujasite type: Influence of water vapour and of Si/Al ratio. **Micropor. Mesopor. Mat.**, v. 111, p. 334-342, 2008.
- HAGINAKA, J.; NAKAGAWA, T.; UNO, T. Stability of clavulanic acid in aqueous solution. **Chem. Pharm. Bull.**, v. 29, p. 3334-3341, 1981.
- HAMED, R. B.; GOMEZ-CASTELLANOS, J. R.; HENRY, L.; DUCHO, C.; MCDONOUGH, M. A.; SCHOFIELD, C. J. The enzymes of beta-lactam biosynthesis. **Nat. Prod. Rep.**, v. 30, p. 21-107, 2013.
- HERMOSÍN, M. C.; PAVLOVIC, I.; ULIBARRI, M. A.; CORNEJO, J. Hydrotalcite as sorbent for trinitrophenol: sorption capacity and mechanism. **Water Res.**, v. 30, p. 171-177, 1994.

HIBINO, T. Delamination of layered double hydroxides containing amino acids.

**Chem. Mater.**, v. 16, p. 5482-5488, 2004.

HIRATA, D. B.; OLIVEIRA, J. H. H. L.; LEÃO, K. V.; RODRIGUES, M. I.;

FERREIRA, A. G.; GIULIETTI, M.; BARBOZA, M.; HOKKA, C. O.

Precipitation of clavulanic acid from fermentation broth with potassium 2-ethyl hexanoate salt. **Sep. Purif. Technol.**, v. 66, p. 598-605, 2009.

HO, Y. S.; MCKAY, G. Sorption of dye from aqueous solution by peat, **Chem. Eng.**

**J.**, v. 70, p. 115-124, 1998.

HOWARTH, T. T.; BROWN, A. G.; KING, T. J. Clavulanic acid, a novel  $\beta$ -lactam

isolated from *Streptomyces clavuligerus*: X-ray crystal structure analysis. **J.**

**Chem. Soc. Chem. Commun.**, p. 266-267, 1976.

INACIO, J.; TAVIOT-GUÉHO, C.; FORANO, C.; BESSE, J.-P. Adsorption of MCPA

pesticide by MgAl-layered double hydroxides. **Appl. Clay Sci.**, v. 18, p. 255-264, 2001.

JAMIESON, C. E.; LAMBERT, P. A.; SIMPSON, I. N. In vitro and in vivo activities

of AM-112, a novel oxapenem. **J. Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 47, p.

1652-1657, 2003.

KAMIMURA, E. S.; MAUGERI FILHO, F. Cromatografia de afinidade. In: PESSOA

JR., A.; KILIKIAN, B. V. **Purificação de Produtos Biotecnológicos**, Barueri:

Editora Manole, 2005, p. 231-267.

KENNEDY, J. F.; CABRAL, J. S. **Recovery processes for biological materials.**

Chichester: J. Wiley, 1993.

KHRAISHEH, M. A. M.; AL-DEGS, Y. S.; ALLEN, S. J.; AHMAD, M. N. Elucidation of Controlling Steps of Reactive Dye Adsorption on Activated Carbon, **Ind. Eng. Chem. Res.**, v. 41, p. 1651-1657, 2002.

KIM, I. C.; KIM, C. H.; HONG, S. I.; KIM, S. W. Fed-batch cultivation for the production of clavulanic acid by an immobilized *Streptomyces clavuligerus* mutant. **World J. Microbiol. Biotechnol.**, v. 17, p. 869-872, 2001.

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

KUHN, R. C. **Purificação de oligossacarídeos utilizando coluna de leito fixo de zeólitas.** 2006. 77 p. Dissertação (Mestre em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.

LAGERGREN, S. About the theory of so-called adsorption of soluble substances. **Kungliga Svenska Vetenskapsakademiens. Handlingar**, v. 24(4), p. 1-39, 1898.

LAL, M.; HOWE, A. T. Studies of zinc-chromium hydroxy salts. II. Composite anion conductors of pressed disks of  $[Zn_2Cr(OH)_6]X \cdot nH_2O$ , where  $X^- = F^-$ ,  $Cl^-$ ,  $Br^-$ ,  $I^-$ ,  $NO_3^-$  and  $1/2CO_3^{2-}$ . **J. Solid State Chem.**, v. 39, p. 377-386, 1981.

LI, R.; TOWNSEND, C. A. Rational strain improvement for enhanced clavulanic acid production by genetic engineering of the glycolytic pathway in *Streptomyces clavuligerus*. **Metab. Eng.**, v. 8, p. 240-252, 2006.

LODE, H. Role of sultamicillin and ampicillin/sulbactam in the treatment of upper and lower bacterial respiratory tract infections. **Int. J. Antimicrob. Agents**, v. 18, p. 199-209, 2001.

MAITI, S. N.; PHILLIPS, O. A.; MICETICH, R. G.; LIVERMORE, D. M.  $\beta$ -Lactamase inhibitors: agents to overcome bacterial resistance. **Curr. Med. Chem.**, v. 5, p. 441-456, 1998.

MAUGERI FILHO, F.; MENDIETA-TABOADA, O. Cromatografia de interação hidrofóbica. In: PESSOA JR., A.; KILIKIAN, B. V. **Purificação de Produtos Biotecnológicos**, Barueri: Editora Manole, 2005, p. 212-230.

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, 1996a.

MAYER, A. F.; DECKWER, W. D. Ion-pair adsorption chromatography for process purposes Basic equilibrium studies for the recovery of clavulanic acid by using quaternary ammonium salts. **J. Chromatogr. A**, v. 741, p. 185-203, 1996b.

MAYER, A. F.; ANSPACH, F. B.; DECKWER, W. D. Purification of clavulanic acid by ion-pairing system. **Biosepar.**, v. 6, p. 25-39, 1996.

MAYER, A. F.; HARTMANN, R.; DECKWER, W. D. Diffusivities of clavulanic acid in porous sorption systems with ion pairing. **Chem. Eng. Sci.**, v. 52, p. 4561-4568, 1997.

- MORAES, A. M.; ROSA, P. T. V. Cromatografia de exclusão molecular. In: PESSOA JR., A.; KILIKIAN, B. V. **Purificação de Produtos Biotecnológicos**, Barueri: Editora Manole, 2005, p. 176-195.
- MORAES, C. C.; MAZUTTI, M. A.; RODRIGUES, M. I.; MAUGERI FILHO, F.; KALIL, S. J. Mathematical modeling and simulation of inulinase adsorption in expanded bed column. **J. Chromatogr. A**, v. 1216, p. 4395-4401, 2009.
- MORÃO, A. I. C.; BRITES ALVES, A. M.; COSTA, M. C.; CARDOSO, J. P. Nanofiltration of a clarified fermentation broth. **Chem. Eng. Sci.**, v. 61, p. 2418-2427, 2006a.
- MORÃO, A. I. C.; BRITES ALVES, A. M.; AFONSO, M. D. Concentration of clavulanic acid broths: influence of membrane surface charge density on NF operation. **J. Membrane. Sci.**, v. 281, p. 417-428, 2006b.
- MORÃO, A. I. C.; BRITES ALVES, A. M.; COSTA, M. C.; CARDOSO, J. P. Optimization of operation mode for the concentration by NF of clarified fermentation broths. **Desalination**, v. 200, p. 472-474, 2006c.
- MORÃO, A. I. C.; SZYMCZYK, A.; FIEVET, P.; BRITES ALVES, A. M. Modelling the separation by nanofiltration of a multi-ionic solution relevant to an industrial process. **Chem. Eng. Sci.**, v. 322, p. 320-330, 2008.
- NEWMAN, A. C. D. **Chemistry of Clays and Clay Minerals**. New York: Wiley-Interscience, 1987.

OLIVEIRA, J. H. H. L.; GRANATO, A. C.; HIRATA, D. B.; HOKKA, C. O.; BARBOZA, M.; TRSIC, M. Ácido clavulânico e cefamicina C: uma perspectiva da biossíntese, processos de isolamento e mecanismo de ação. **Quím. Nova**, v. 32, p. 2142-2150, 2009.

ONU, Convenção sobre Diversidade Biológica (Artigo 2. Utilização de Termos). **Organização das Nações Unidas**. 1992. Recuperado em 27 de março de 2008. [online] Disponível na internet. Arquivo capturado em 20 de janeiro de 2013 via <http://pt.wikipedia.org/wiki/Biotecnologia>.

ORTHMAN, J.; ZHU, H.Y.; LU, G. Q. Use of anion clay hydrotalcite to remove coloured organics from aqueous solutions. **Sep. Purif. Technol.**, v. 31, p. 53-59, 2003.

ORTIZ, S. C. A.; HOKKA, C. O.; BADINO, A. C. Utilization of soybean derivates on clavulanic acid production by *Streptomyces clavuligerus*. **Enzyme and Microb. Technol.**, v. 40, p. 1071-1077, 2007.

O'SULLIVAN, J.; SYKES, R. B.  $\beta$ -Lactam antibiotics. In: PAPE, H.; REHM, H. J. **Biotechnology, a comprehensive treatise in 8 volumes**. Weinheim: VCH, 1986.

PAGE, M. G. P.  $\beta$ -lactamase inhibitors. **Drug Resist. Updates**, v. 3, p. 109-125, 2000.

PAREDES, R. R. **Modelagem matemática e simulação de purificação de cefalosporina C em coluna de leito fixo**. 1996. 97 p. Dissertação (Mestre em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1996.

PAYNE, D. J., CRAMP, R.; WINSTANLEY, D. J.; KNOWLES, D. J. C. Comparative activities of clavulanic acid, sulbactam, and tazobactam against clinically important  $\beta$ -lactamases. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 38, p. 767-772, 1994.

PESSOA JR., A. Cromatografia de troca-iônica. In: PESSOA JR., A.; KILIKIAN, B. V. **Purificação de Produtos Biotecnológicos**, Barueri: Editora Manole, 2005, p. 196-211.

READING, E.; COLE, M. Clavulanic acid: a beta-lactamase inhibitor from *Streptomyces clavuligerus*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 11, p. 852-857, 1977.

REED, M. D. Rational prescribing of extended-spectrum penicillin  $\beta$ -lactamase inhibitor combinations: focus on ticarcillin/clavulanic acid. **Annal. Pharmacother**, v. 32, p. S17-21, 1998.

REICHLER, W. T. Synthesis of anionic clays minerals (mixed metal hydrocites, hydrotalcite). **Solid State Ionics**, v.22, 135-141, 1986.

ROY, A.; FORANO, C.; EL MALKI, K.; BESSE, J.-P. Anionic Clays: Trends in Pillaring Chemistry. In: OCCELLI, M. L.; ROBSON, H. E. **Synthesis of Microporous Materials**, New York: Van Nostrand Reinhold, 1992, p. 108-169.

RUTHVEN, D. M. **Principles of Adsorption and Adsorption Processes**. New York: Wiley, 1984.

QIU, H.; LV, L.; PAN, B.; ZHANG, Q.; ZHANG, W.; ZHANG, Q. Critical review in adsorption kinetic models. **J. Zhejiang Univ. Sci. A**, v. 10(5), p. 716-724, 2009.

SAUDAGAR, P. S.; SURVASE, S. A.; SINGHAL, R. S. Clavulanic acid: A review. **Biotechnol. Adv.**, v. 26, p. 335-351, 2008.

SCHMAL, M. **Cinética e Reatores**. Rio de Janeiro: Synergia, 2010.

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

SILVA, C. S. **Purificação do ácido clavulânico por processo de filtração tangencial, extração por sistemas de duas fases aquosas e re-extração com resina de troca iônica**. 2010. 194 p. Tese (Doutor em Engenharia Química) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2010.

SILVA, C. S.; BOVAROTTI, E.; RODRIGUES, M. I.; HOKKA, C. O.; BARBOZA, M. Evaluation of the effects of the parameters involved in the purification of clavulanic acid from fermentation broth by aqueous two-phase systems. **Bioproc. Biosyst. Eng.**, v. 32, p. 625-632, 2009.

SILVÉRIO, F. **Adsorção de aminoácidos em hidróxidos duplos lamelares: efeito da temperatura, pH e força iônica do meio**. 2004. 132 p. Dissertação (Mestre em Ciências) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2004.

SOARES, J. L. **Desenvolvimento de novos adsorventes e processos híbridos em reforma catalítica por vapor de água.** 2003. 165 p. Tese (Doutor em Engenharia Química) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2003.

SONETAKA, N.; FAN, H-J.; KOBAYASHI, S.; CHANG, H-N.; FURUYA, E. Simultaneous determination of intraparticle diffusivity and liquid film mass transfer coefficient from a single-component adsorption uptake curve. **J. Hazard. Mater.**, v. 164, p. 1447-1451, 2009a.

SONETAKA, N.; FAN, H-J.; KOBAYASHI, S.; SU, Y-C.; FURUYA, E. Characterization of adsorption uptake curves for both intraparticle diffusion and liquid film mass transfer controlling systems. **J. Hazard. Mater.**, v. 165, p. 232-239, 2009b.

STEIN, G. E.; GURWITH, M. J. Amoxicillin-potassium clavulanate, a  $\beta$ -lactamase-resistant antibiotic combination. **Clin. Pharm.**, v. 3, p. 591-599, 1984.

SULAK, M.T.; DEMIRBAS, E.; KOBYA, M. Removal of astrazon yellow 7GL from aqueous solutions by adsorption onto wheat bran. **Bioresource Technol.**, v. 98, p. 2590-2598, 2007.

SUN, Y.; ZHOU, Y.; YE, X.; CHEN, J.; WANG, Z. Fabrication and infrared emissivity study of hybrid materials based on immobilization of collagen onto exfoliated LDH. **Mater. Lett.**, v. 62, p. 2943-2946, 2008.

- TEODORO, J. C.; BAPTISTA-NETO, A.; CRUZ-HERNÁNDEZ, I. L.; HOOKA, C. O.; BADINO, A. C. Influence of feeding conditions on clavulanic acid production in fed-batch cultivation with medium containing glycerol. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 72, p. 450-455, 2006.
- TRIFIRO, F.; VACCARI, A. Hydrotalcite-like anionic clays (layered double hydroxides). In: ALBERT, G.; BEIN, T. **Comprehensive Supramolecular Chemistry**. Oxford: Elsevier, 1996, p. 251-291.
- YANG, L.; DADWHAL, M.; SHAHRIVARI, Z.; OSTWAL, M.; LIU, P. K. T.; SAHIMI, M.; TSOTSIS, T. T. Adsorption of arsenic on layered double hydroxides: effect of the particle size. **Ind. Eng. Chem. Res.**, v. 45, p. 4742-4751, 2006.
- YANG, L.; SHAHRIVARI, Z.; LIU, P. K. T.; SAHIMI, M.; TSOTSIS, T. T. removal of trace levels of arsenic and selenium from aqueous solutions by calcined and uncalcined layered double hydroxides (LDH). **Ind. Eng. Chem. Res.**, v. 44, p. 6804-6815, 2005.
- YU, Y. C.; HUANG, Y. C.; LEE, T. Y. Purification of antibodies from protein mixtures and mouse ascites fluid using zeolite X. **Biotechnol. Prog.**, v. 14, p. 332-337, 1998.
- ZELDOWITSCH, J. Über den mechanismus der katalytischen oxydation von CO an MnO<sub>2</sub>. **Acta Physicochemical URSS**, v. 1, p. 364-449, 1934.



## CAPÍTULO 2

### **Evaluation of clavulanic acid adsorption in MgAl-layered double hydroxides: kinetic, equilibrium and thermodynamic studies**

*Artigo publicado:*

*Adsorption Science and Technology, v. 30, p. 65-80, 2012.*

*DOI: 10.1260/0263-6174.30.1.65*



## **Evaluation of clavulanic acid adsorption in MgAl-layered double hydroxides: kinetic, equilibrium and thermodynamic studies**

**Marcus Bruno Soares Forte<sup>1\*</sup>, Élen Cristina Luna Elias<sup>1</sup>, Heloise O. Pastore<sup>2</sup>,  
Francisco Maugeri Filho<sup>1</sup> and Maria Isabel Rodrigues<sup>1</sup>**

*(1) Laboratory of Bioprocess Engineering, Food Engineering Department, School of Food Engineering, University of Campinas (UNICAMP), R. Monteiro Lobato, 80, Campinas-SP, 13083-862, Brazil.*

*(2) Micro and Mesoporous Molecular Sieves Group, Institute of Chemistry, University of Campinas – UNICAMP, P.O. Box 6154, Campinas-SP, 13083-970, Brazil.*

*(Received 26 August 2011; accepted 13 November 2011)*

**ABSTRACT:** Kinetics, equilibrium and thermodynamic studies of clavulanic acid adsorption onto hydrotalcites have been conducted with the aim of selecting the best conditions for biomolecular separation. For this purpose, hydrotalcites of different compositions (containing 30, 63 and 70 % MgO in their compositions) were tested, with and without pre-treatment (uncalcined and calcined). A model was obtained to predict the degradation constant. This model may be useful in predicting the extent of clavulanic acid hydrolysis in the adsorption process. Adsorption studies were performed in stirred batch glass reactors. Assays were performed using solutions under different conditions, as well as variable

solid/liquid ratio. It was shown that distilled water and a solid/liquid ratio of 15.0 mg/L generated the most favourable conditions for adsorption. A calcined hydrotalcite containing 70 % of MgO was selected for further study since it presented the best adsorption performance. The adsorbents were characterized by X-ray diffraction methods, Fourier-transform infrared spectroscopy and scanning electron microscopy. Adsorption equilibrium was evaluated from adsorption isotherms determined at different temperatures. The experimental isotherm data were well fitted by a linear equilibrium model with the corresponding adsorption constants being  $k_{lin} = 0.404, 0.602, 0.849$  and  $1.083$  L/g at 16.5, 19.0, 21.5 and 24.0°C, respectively, showing an increased adsorption capacity at higher temperatures. Thermodynamic evaluation of the process allowed the Gibbs' free energy ( $\Delta G^0$ ), the standard enthalpy change ( $\Delta H^0$ ) and the standard entropy change ( $\Delta S^0$ ) to be estimated as follows:  $\Delta G^0 = 2.100, 1.301, 0.503$  and  $-0.295$  kJ/mol at 16.5, 19.0, 21.5 and 24.0°C, respectively;  $\Delta H^0 = 94.602$  kJ/mol; and  $\Delta S^0 = 0.319$  kJ/(mol.K), respectively. A spontaneous adsorption process ( $\Delta G^0 < 0$ ) is noticed only for temperatures above 24.0°C. The positive value of  $\Delta S^0$  corresponds to an increase in the degree of freedom of the adsorbed CA molecules. The positive value of  $\Delta H^0$  confirmed the endothermic nature of clavulanic acid adsorption onto HT70c hydrotalcites, which was considered to be mass transport reaction-controlled process.

## NOTATION

- B      concentration of phosphate buffer (mM)
- CA     clavulanic acid
- C      CA concentration in the liquid phase (mg/L)

$C^*$	CA concentration in the liquid phase at equilibrium (mg/L)
$C_0$	initial concentration of CA in the liquid phase (mg/L)
HT	hydrotalcite
$k_{lin}$	adsorption coefficient (L/g)
$k_d$	dissociation constant (mg/L)
$k_F$	constant of Freundlich model [ $(mg^{1-n_F} L^{n_F}) / g$ ]
$k_h$	hydrolysis coefficient ( $h^{-1}$ )
$m$	mass of hydrotalcite (g)
$n_F$	index in Freundlich model
$q^*$	adsorption capacity (mg/g)
$q_m$	maximum adsorption capacity (mg/g)
$V_{sol}$	volume of solution (mL)
$T$	temperature ( $^{\circ}C$ )
$t$	time (min, h)
$t^*$	equilibrium time (min)
$\varepsilon_{st}$	solid/liquid ratio in the stirred tank reactor (mg/mL)
$\Delta G^0$	Gibbs' free energy (kJ/mol)
$\Delta H^0$	standard enthalpy change (kJ/mol)
$\Delta S^0$	standard entropy change [kJ/(mol.K)]

## 2.1 INTRODUCTION

Many valuable bio-products are obtained via fermentation processes. Since nearly 90 % of the production costs of biomolecules can be attributed to the downstream step (Moraes et al., 2009), innovative processes in this field can contribute not only to new technical aspects, but also to considerable reductions in the total production costs and improved sustainability. Thus, new challenges involving separation and purification processes are constantly being considered by various industries.

Researchers have shown that clavulanic acid (CA) is the main  $\beta$ -lactam component produced by *Streptomyces clavuligerus* (Saudagar et al., 2008). It is considered to be a potential inhibitor of  $\beta$ -lactamases, which are enzymes that hydrolyze  $\beta$ -lactam antibiotics and reduce their efficiency. Products found on the market with CA in their composition are responsible for financial activities amounting to about US\$ 2 billion in more than 150 countries (Elander, 2003).

The technique most commonly employed for the separation and purification of CA is ion exchange as reported by some authors (Barboza et al., 2003; Silva et al., 2009). However, in order to develop new techniques which are economically and industrially viable, new low-cost adsorbents need to be studied in order to reduce the costs associated with such processes. However, the reported yields for ion-exchange adsorption and liquid-liquid extraction processes involving CA are commonly low. In fact, the extremely unstable structure of this molecule leads to its fast degradation under normal processing conditions. Thus, to design effective and selective separation processes, knowledge of how the operating conditions affect the adsorption kinetics and equilibrium is required, as

well as the selection of a suitable adsorbent that fulfils the technical and economic requirements necessary to make the process feasible. In addition, estimation of CA hydrolysis rates is important due to its instability under certain temperature and pH conditions (Bersanetti et al., 2005; Santos et al., 2009).

Alternative adsorbents such as active carbon, hydrotalcites, zeolites and carbon molecular sieves have been reported for the separation, purification and immobilization of biomolecules such as sugars, amino acids, antibiotics or enzymes (Yu et al., 1998; Boon et al., 2000; Hibino, 2004; Chang et al., 2006; Forte and Maugeri, 2007; Kuhn and Maugeri, 2010).

Layered double hydroxides (LDH) are lamellar mixed hydroxides containing positively charged structural layers capable of anion-exchange. These layers consist essentially of divalent and trivalent cations and hydroxyl anions, while the interlayer domain of LDH is mainly constituted of water molecules and anions (Goh et al., 2008). Because of their unique layered structure and anion-exchange capabilities, LDH have recently received considerable attention. LDH have widespread applications and a variety of layered materials have been synthesized by different methods (Tang et al., 2008). The most interesting properties of LDH include large surface areas, high anion-exchange capacities (which are comparable to those of anion-exchange resins) and good thermal stabilities (Goh et al., 2008).

Hydrotalcites comprise one of the most representative minerals of the group, whose divalent and trivalent cations and intercalated anions are  $Mg^{2+}$ ,  $Al^{3+}$  and  $CO_3^{2-}$ , respectively. The chemical formula of hydrotalcite may be written as  $Mg_{0.75}Al_{0.25}(OH)_2(CO_3)_{0.50} \cdot 0.5H_2O$  and abbreviated to [Mg-Al- $CO_3$ ] (Forano et al., 2006). Due to the presence of large interlayer spaces and the significant number of

exchangeable anions, hydrotalcites have the potential to be good ion-exchangers and adsorbents for a diverse number of inorganic and organic anions (Cai et al., 1994; Hermosín et al., 1994; Inacio et al., 2001; Orthman et al., 2003; Dupin et al., 2004; Lv et al., 2006; Yang et al., 2006; Laguna et al., 2007; Bonina et al., 2008).

CA molecules are negatively charged under optimal conditions and the use of hydrotalcites as adsorbents for these molecules represents an interesting alternative to conventional methods for the separation of components from fermentation broths. For this reason, kinetics, equilibrium and thermodynamic studies on the adsorption of CA adsorption in hydrotalcites have been undertaken in the present work with the objective of characterizing the adsorption process and selecting the best conditions for separation.

## **2.2 METHODOLOGY**

### **2.2.1 CLAVULANIC ACID ANALYSIS**

CA concentrations were determined by spectrophotometric analysis of the product derived from the reaction of CA with imidazole. The classical spectrophotometric method (Bird et al., 1982) was used employing Clavulin<sup>®</sup> as the standard. Analyses were carried out in a DU<sup>®</sup> 640 (Beckman Coulter<sup>™</sup>, U.S.A.) spectrophotometer.

### **2.2.2 ESTIMATION OF THE HYDROLYSIS COEFFICIENT USING FACTORIAL DESIGN**

CA is an unstable molecule which can undergo significant hydrolysis during adsorption processes. Various authors have studied the stability of CA

under temperature, pH and buffer concentration (ionic strength) conditions (Bersanetti et al., 2005; Santos et al., 2009). However, such studies have not been undertaken with simultaneous changes of these factors. The factorial design technique is a useful tool for this purpose. A mathematical model capable of estimating CA hydrolysis as a function of the experimental conditions is required, since some relevant factors – the pH, for example – may not be constant during the process. The CA hydrolysis parameter ( $k_h$ ) was evaluated via a central composite rotatable design (CCRD) in which the temperature, pH and buffer concentration are considered as independent factors. The significant terms were considered by the hypothesis test at 95 % confidence ( $p < 0.05$ ) (Rodrigues and Iemma, 2009). The responses were evaluated by Statistica® 8.0 (Statsoft Inc). The response  $k_h$  was calculated using the same methodology presented previously (Bersanetti et al., 2005).

### 2.2.3 HYDROTALCITES

The different hydrotalcites [Mg-Al-CO<sub>3</sub>] were kindly donated by Sasol GmbH, Hamburg, Germany. The various products, viz. PURAL®MG 30, PURAL®MG 63HT and PURAL®MG 70 (30, 63 and 70 % MgO composition, respectively), with and without pre-treatment (uncalcined and calcined at 500°C for 4 h), giving a total of six different adsorbent conditions. These adsorbents were sieved into fractions with mesh sizes between 65 and 270 (53–212 µm) and are referred to as HT30, HT63, HT70, HT30c, HT63c and HT70c below, where the numerals represent the percentage of MgO in the hydrotalcite while the index “c” indicates calcined adsorbents.

## 2.2.4 CHARACTERIZATION OF ADSORBENTS

The adsorbents were characterized by X-ray diffraction (XRD), Fourier-transform infrared spectroscopy (FT-IR) and scanning electron microscopy (SEM). Powder XRD patterns were recorded in a Shimadzu XRD7000 instrument using CuK $\alpha$  radiation at a scanning rate of 2 $^{\circ}$ (2 $\theta$ ) at room temperature. The FT-IR spectra were measured at 4 cm $^{-1}$  resolution at room temperature on a Nicolet 6700 spectrophotometer employing KBr pellets. SEM images were captured using a JEOL JSM-5900LV microscope in the Brazilian Synchrotron Light Laboratory (LNLS)/Brazilian Biosciences National Laboratory (LNBio), Campinas, Brazil at an accelerating voltage of 15 kV.

## 2.2.5 BATCH ADSORPTION

Experiments were carried out isothermally in a stirred glass reactor containing 100 mL of a CA solution (from the pharmaceutical product Clavulin $^{\circledR}$ ) and hydrotalcite. Runs were performed using two solvents for the CA solutions, i.e. distilled water and a 0.2 M phosphate buffer solution at pH 6.6. A variable solid fraction was used in the reactor ( $\epsilon_{st}$ ). Initial pH values were obtained using 0.1 M and 1.0 M HCl solutions. Samples were periodically withdrawn from the reactor and their CA concentrations determined. The most suitable experimental conditions and the most appropriate adsorbents were determined on the basis of these experiments and the adsorbent selected was used in subsequent tests. Adsorption profiles were evaluated from the relative concentration at equilibrium ( $C^*/C_0$ ) and the adsorption capacity ( $q^*$ ) as determined from equation 2.1 below:

$$q^* = \frac{(C_0 - C^*)V_{Sol}}{m} \quad (2.1)$$

the mass of hydrolyzed CA was estimated from the hydrolysis coefficient, which was determined by factorial design and was considered in the adsorption processes.

## 2.2.6 EQUILIBRIUM ISOTHERMS

Adsorption equilibrium was evaluated from the adsorption isotherms determined using the same experimental apparatus as the kinetic studies, the amount of CA adsorbed at equilibrium (the adsorption capacity) being calculated via equation 2.1 above. Different isotherm models were employed to fit the experimental results, thereby allowing the most appropriate for the system to be obtained. The models tested were the linear, Langmuir and Freundlich models, respectively, which may be expressed mathematically as in equations 2.2 to 2.4, respectively:

$$q^* = k_{lin} C^* \quad (2.2)$$

$$q^* = \frac{q_m C^*}{k_d + C^*} \quad (2.3)$$

$$q^* = k_F (C^*)^{n_F} \quad (2.4)$$

## 2.3 RESULTS AND DISCUSSION

### 2.3.1 CLAVULANIC ACID HYDROLYSIS

Hydrolysis was evaluated as a function of temperature (T), pH and buffer concentration (B) as experimental parameters (factors), using a central composite rotatable design (CCRD). The ranges of T, pH and B were from 10–40 °C, 5.0–10.0

and 5.0–50.0 mM, respectively, as listed in Table 2.1. It can be observed from the data recorded in the table that temperature and pH played an important role in CA hydrolysis. The lowest hydrolysis constant ( $k_h = 2.04 \times 10^{-3} \text{ h}^{-1}$ ) occurred in Run 5, where the temperature and the pH were at their lowest levels ( $T = 16.0^\circ\text{C}$  and  $\text{pH} = 6.0$ ) and the buffer concentration was 41.0 mM.

**Table 2.1:** Data of the CCRD for CA hydrolysis, with results for the hydrolysis constant ( $k_h$ ).

Runs	T (°C)	pH	B (mM)	$k_h \times 10^3 \text{ (h}^{-1}\text{)}$	$\ln(k_h)$
1	-1 (16.0)	-1 (6.0)	-1 (14.0)	4.29	-5.45
2	+1 (34.0)	-1 (6.0)	-1 (14.0)	6.25	-5.08
3	-1 (16.0)	+1 (9.0)	-1 (14.0)	11.69	-4.45
4	+1 (34.0)	+1 (9.0)	-1 (14.0)	26.84	-3.62
5	-1 (16.0)	-1 (6.0)	+1 (41.0)	2.04	-6.19
6	+1 (34.0)	-1 (6.0)	+1 (41.0)	12.73	-4.36
7	-1 (16.0)	+1 (9.0)	+1 (41.0)	15.72	-4.15
8	+1 (34.0)	+1 (9.0)	+1 (41.0)	54.62	-2.91
9	-1.68 (10.0)	0 (7.5)	0 (27.5)	4.30	-5.45
10	+1.68 (40.0)	0 (7.5)	0 (27.5)	25.00	-3.69
11	0 (25.0)	-1.68 (5.0)	0 (27.5)	5.95	-5.12
12	0 (25.0)	+1.68 (10.0)	0 (27.5)	108.81	-2.22
13	0 (25.0)	0 (7.5)	-1.68 (5.0)	6.75	-5.00
14	0 (25.0)	0 (7.5)	+1.68 (50.0)	9.67	-4.64
15	0 (25.0)	0 (7.5)	0 (27.5)	6.57	-5.03
16	0 (25.0)	0 (7.5)	0 (27.5)	5.51	-5.20
17	0 (25.0)	0 (7.5)	0 (27.5)	5.87	-5.14

Increasing the temperature (T) from 10°C to 40°C caused an increase in  $k_h$  from 4.30 h<sup>-1</sup> to 25.00 h<sup>-1</sup>. With respect to the other factors in Table 2.1, it can be seen that  $k_h$  increased from 5.95 h<sup>-1</sup> to 108.81 h<sup>-1</sup> when the pH increased from 5.0 to 10.0, and from 6.75 h<sup>-1</sup> to 9.67 h<sup>-1</sup> when the buffer concentration (B) was increased from 5.0 mM to 50.0 mM. These results suggest that the most significant influences were due to both temperature and pH.

The effect of buffer concentration was not significant (at 95 % confidence,  $p < 0.05$ ) at the studied levels and was thus removed from the model (equation 2.5), except for the effect arising from its interaction with temperature which was significant. Also, in this model, other interactions between pH, T and B were not significant, as were the second-order terms for T and B which were consequently excluded as well. The coded model found considering the significant terms by the hypothesis test at 95 % confidence ( $p < 0.05$ ) is given by:

$$\ln k_h = -4.91 + 0.53 (T) + 0.79 (pH) + 0.42 (pH)^2 + 0.23 (T B) \quad (2.5a)$$

or

$$k_h = \exp(-4.91 + 0.53 (T) + 0.79 (pH) + 0.42 (pH)^2 + 0.23 (T B)) \quad (2.5b)$$

This equation is a coded reduced model and, consequently, can only be used with coded parameters, as expressed in Table 2.1. The analysis of variance (ANOVA), considering only the significant terms, is presented in Table 2.2. According to this analysis, the variance was well explained ( $R^2 = 0.943$ ) and the test was satisfactory, since the calculated F ( $F_{\text{calc}} = 49.53$ ) was more than 15-times greater than the listed value ( $F_{\text{list}} = 3.26$ ) (Rodrigues and Iemma, 2009). Thus, the proposed model was considered adequate to explain the phenomenon, which is represented in a coded form by equation 2.5. In this equation, an unusual logarithmic form of  $k_h$  was adopted since its variation was quite high, from 2.04 h<sup>-1</sup>

in Run 5 to 108.81 h<sup>-1</sup> in Run 12, which hindered the fitting of the model. The logarithmic form adopted provided a way of smoothing this variation so that the fit was improved:

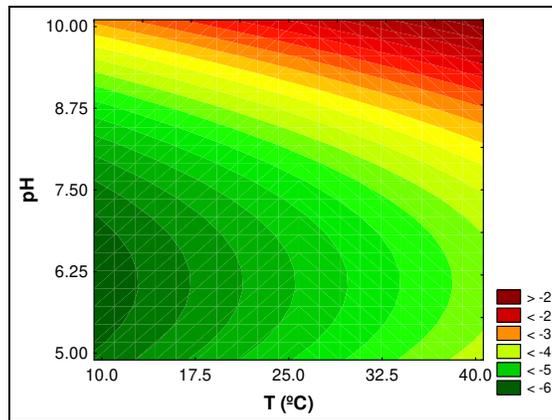
**Table 2.2:** Analysis of variance (ANOVA) of the CA hydrolysis model.

Source of variation	Sum of squares	Degrees of freedom	Mean square	F <sub>calc</sub>
Regression	15.16	4	3.790	49.53
Residues	0.92	12	0.077	
Total	16.08	16		

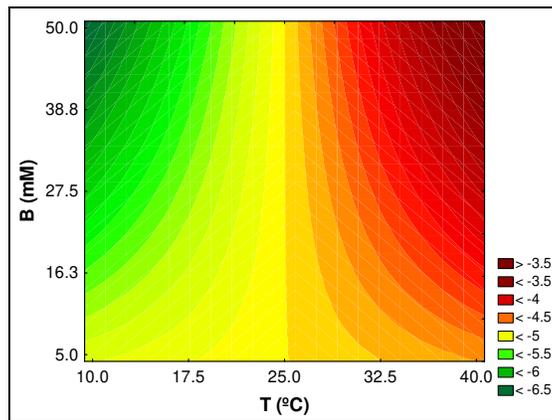
$$R^2 = 0.943; F_{list} (4,12,0.5) = 3.26$$

The contour curves related to the model are shown in Figure 2.1. It will be seen from the figure that the higher the temperature and pH, higher the rate of CA hydrolysis. Minimal CA degradation occurred at lower temperatures and neutral pH ( $6 < \text{pH} < 7$ ). According some authors, the optimal conditions for the CA stability are low temperatures (as low as possible) and pH 6.2 (Bersanetti et al., 2005). The results of the present study are similar to those reported in the literature. However, the use of the factorial design technique allowed the interaction effects between temperature and buffer concentration (which is related to ionic strength) to be visualized (Figure 2.2), since this latter parameter did not have significant influence (as a principal effect) on the hydrolysis of CA.

The model (equation 2.5) which predicts that CA degradation depended on the environment conditions (temperature and pH) was then used in the adsorption calculations.



**Figure 2.1:**  $\ln(k_h)$  as a function of the temperature and pH.



**Figure 2.2:**  $\ln(k_h)$  as a function of the temperature and buffer concentration.

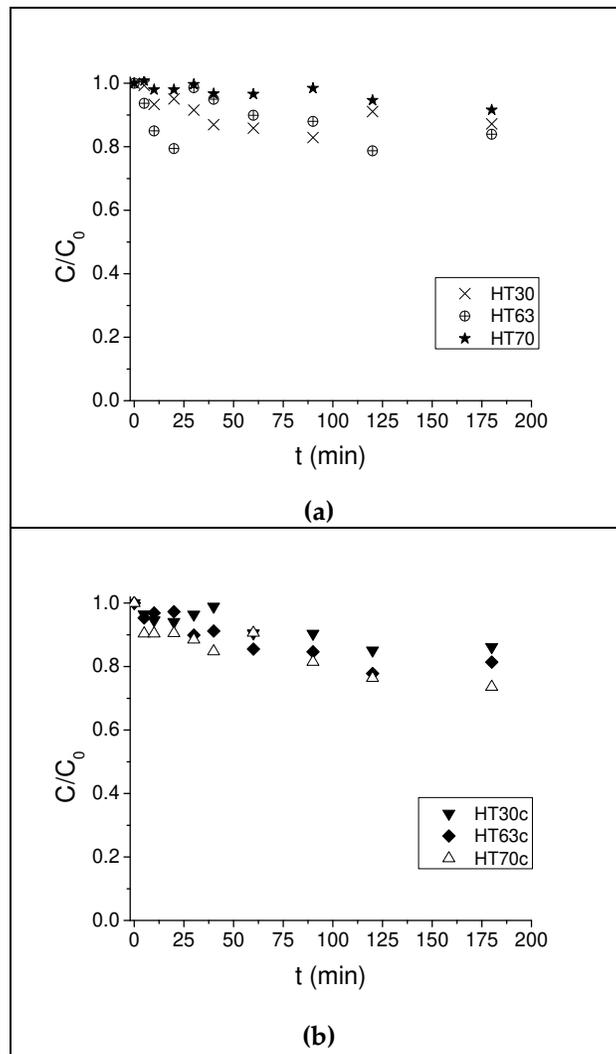
### 2.3.2 ADSORPTION KINETICS

In the assays carried out in order to study the kinetics of the adsorption process, the temperature of 30°C was adopted since adsorption is better at this temperature, although CA degradation is high. Differences in degradation rate between 30°C and lower temperatures as used in the industrial practice (15-20°C) are not very high nor important at this stage of the study. On the other hand, adsorption characteristics are improved at this higher temperature. An initial

solid/liquid ratio of  $\varepsilon_{st} = 30.0$  mg/mL was used. The CA solutions were prepared with phosphate buffer (0.2 M at pH 6.6). Buffered solutions were used to evaluate the kinetics in different conditions of pH and buffer concentrations. The results for uncalcined and calcined adsorbents are shown in Figure 2.3. It can be observed in this figure that calcination did not improve adsorption, as a high similarity is observed regarding the adsorption at different conditions:  $C^*/C_0 = 0.872, 0.840, 0.916, 0.862, 0.814$  and  $0.736$  for the HT30, HT63, HT70, HT30c, HT63c and HT70c hydrotalcites, respectively. The HT70c hydrotalcite presented the best results, according to the Tukey's average test for triplicates of  $C^*/C_0$  for each adsorbent, with 95 % confidence ( $\alpha = 0.05$ ).

However, adsorption can be considered low according to the reported capacity of this material in literature. This fact may be explained by the competition caused by phosphate anions present in the buffer. These anions are considerably smaller than the CA anion and may have hindered the CA adsorption process. Other studies indicate the ability of LDH to capture phosphate anions (Goh et al., 2008).

The initial pH of the CA solutions was set between 5.5 and 6.0, however, immediately after the addition of hydrotalcite, the pH increased abruptly to 9.0. Increases in pH have been reported in studies with the use of LDH in adsorption systems (Kang et al., 1999; Seida et al., 2001; Yang et al., 2006). In these works, this problem has been solved using pH control systems ( $2 < \text{pH} < 11$ ) through the addition of NaOH,  $\text{NH}_4\text{OH}$ , HCl or  $\text{HNO}_3$  solutions, ranging in concentration from 0.01 to 1.00 M.



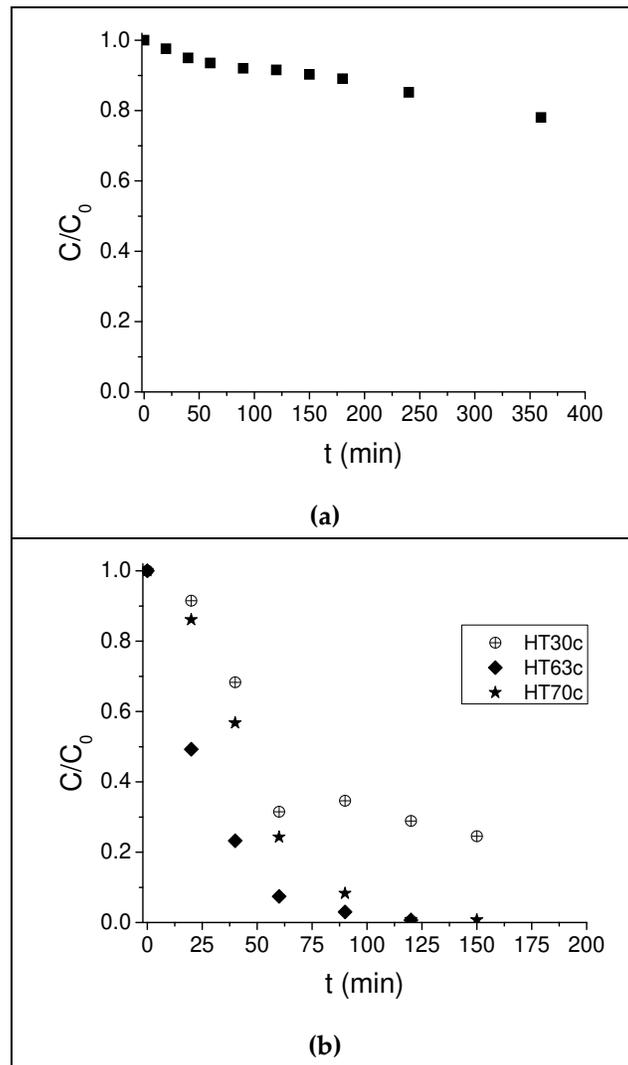
**Figure 2.3:** Adsorption kinetics for CA in (a) uncalcined and (b) calcined hydrotalcites. Solvent: phosphate buffer.  $T = 30^\circ\text{C}$ .  $C_0 = 200 \text{ mg/L}$ .  $\varepsilon_{st} = 30.0 \text{ mg/mL}$ .

However, in this current work, the high speed of the pH increase prevented its control. Furthermore, the continuous addition of solutions during the experiment may have caused dilution of the samples, which impaired the quality of the analysis. The influence of the initial pH, without the adsorbent was also investigated, as previously reported in literature (Inacio et al., 2001; Hibino, 2004; Yang et al., 2005; Lv et al., 2006; Yang et al., 2006). In the experiments carried out in this present work, the initial pH of the CA solutions was set to 2.5 using HCl

solutions (0.1 and 1.0 M). However, there were no significant differences compared to the results without initial pH adjustment and experiments were performed by merely monitoring the pH.

The results on using CA dissolved in distilled water are shown in Figure 2.4. It can be verified that in the experiment carried out with uncalcined hydrotalcite HT63 there was a slight increase in adsorption with distilled water ( $C^*/C_0 = 0.781$ ) compared to that with the buffer ( $C^*/C_0 = 0.840$ ), of which data is shown in Figure 2.3. A decrease in equilibrium time ( $t^*$ ) can also be observed, along with more significant adsorption by the calcined adsorbents. The adsorption properties of adsorbents are directly related to both porosity and surface area. Some authors have also reported the expansion in porous structure of the LDH due to calcinations, given the increase in its surface area and pore volume (Crepaldi and Valim, 1998; Yang et al., 2005).

Usually calcined materials show higher adsorption capacity and efficiency than those uncalcined, because of the higher surface areas and anion adsorption of the calcined hydrotalcites. When calcined LDH are put in contact with anion-containing waters, they rapidly rehydrate and adsorb the anions (Crepaldi et al., 2002; Yang et al., 2006). This phenomenon occurs when the LDH, usually containing carbonate in the interlayer spaces, is calcined at temperatures high enough to eliminate most of the interlayer anions and is then brought into contact with solutions of the same or different anions. This ability highlights the reuse and recycling potential of the adsorbent which is essential for scaled up applications (Yang et al., 2005). Several works in literature have reported the use of calcined LDH (many of them hydrotalcites) for the adsorption of organic and inorganic anions (Orthman et al., 2003; Lv et al., 2006; Yang et al., 2006; Laguna et al., 2007; Dadwhal et al., 2009).



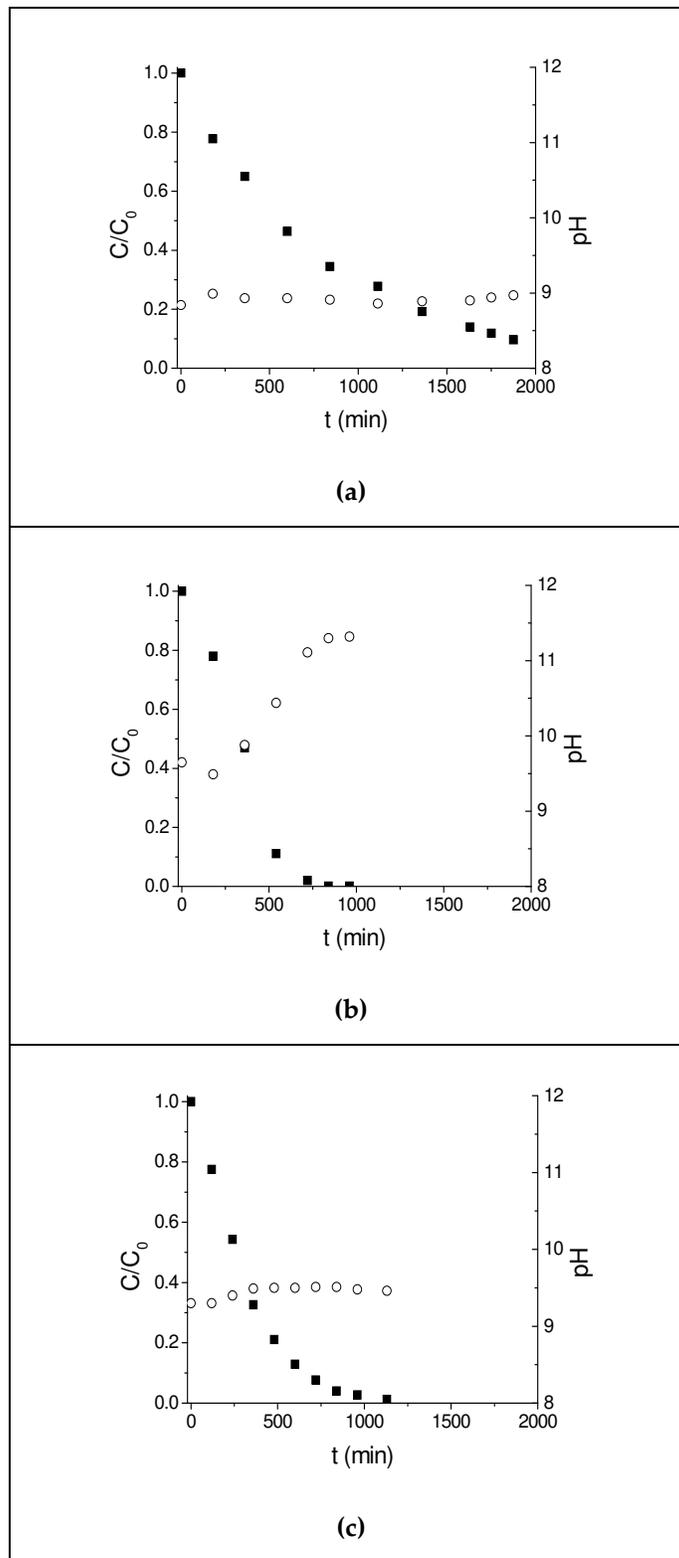
**Figure 2.4:** Adsorption kinetics for CA in (a) uncalcined HT63 and (b) calcined hydrotalcites. Solvent: distilled water.  $T = 30^{\circ}\text{C}$ .  $C_0 = 200$  mg/L.  $\varepsilon_{st} = 30.0$  mg/mL.

Moreover, the increased capacity of the calcined adsorbent led to the adsorption of all CA present in the solution. The amount of negative sites in calcined hydrotalcites is probably higher than the amount of CA anions, and for this reason the equilibrium was not reached. A qualitative analysis may be useful in evaluating the potential of different adsorbents. Better phenomenological understanding of the process is also desirable, including additional data regarding

equilibrium, as well as kinetics and mass transport features which would enable more precise mathematical modelling of the process, marking an important step towards scaling and industrial feasibility. Therefore, experiments using different solid/liquid ratios were carried out.

Some researchers using LDH in batch systems adopted low  $\epsilon_{st}$  values: 0.1 (Yang et al., 2005), 1.0 (Lv et al., 2006) and 4.0 mg/mL (Mandal and Mayadevi, 2008). However, these authors investigated only adsorption of small anions such as arsenate ( $AsO_4^{3-}$ ), selenate ( $SeO_4^{3-}$ ) and fluoride ( $F^{-1}$ ), respectively. Other authors, using similar systems but for the adsorption of organic anions which are more complex and have larger molecule diameters, such as ethylene glycol, diclophenac, enalapril maleate and methyl orange, adopted higher  $\epsilon_{st}$  values: 17.0 (Stanimirova and Hibino, 2006), 50.0 and 30.0 (Dupin et al., 2004; Bonina et al., 2008), 13.0 (Laguna et al., 2007) and 11.0 mg/mL (Ribeiro, 2008), respectively.

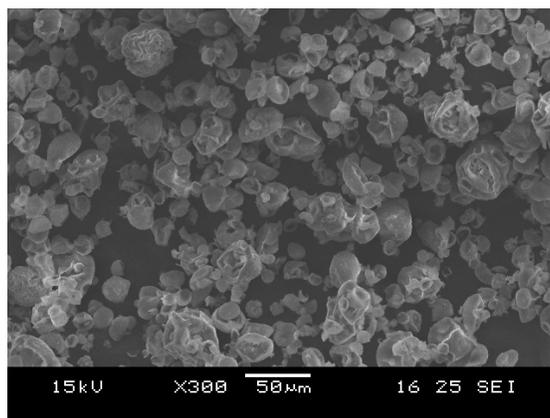
Therefore, in the present work a  $\epsilon_{st}$  of 15.0 mg/mL was used, and the results are shown in Figure 2.5. This solid/liquid ratio led to better results and it was also adopted for the following steps. Adsorptions by the HT63c and HT70c hydrotalcites presented the most suitable results. However, use of the HT63c adsorbent may be considered inadequate due to the increase in pH to undesirable levels (pH  $\approx$  11.5) since CA is very sensitive to high pH values. The HT70c hydrotalcite was therefore selected because it presented a better adsorption profile with considerably low equilibrium concentrations ( $C^*/C_0 \approx 0.05$ ), and an equilibrium time of 1000 min, which is half that of the HT30c hydrotalcite.



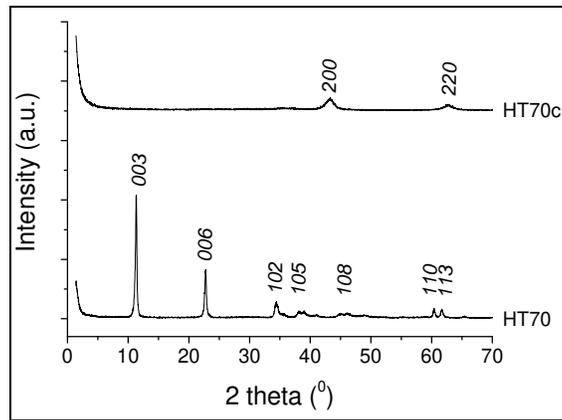
**Figure 2.5:** Adsorption kinetics for CA in (a) HT30c, (b) HT63c and (c) HT70c. Solvent: distilled water.  $T = 30^{\circ}\text{C}$ .  $C_0 = 3,000 \text{ mg/L}$ .  $\varepsilon_{st} = 15.0 \text{ mg/mL}$ . (■)  $C/C_0$  (o) pH.

### 2.3.3 CHARACTERIZATION

The surface morphology of the HT70c particles can be seen in the SEM images, as shown in Figure 2.6. According to the powder XRD patterns in Figure 2.7, a well crystallized structure of the HT70 hydrotalcite [Mg-Al-CO<sub>3</sub>] can be observed. Diffraction peaks are typical of this LDH type structure (hydrotalcites). The characteristic reflections can be separated in two groups: symmetric reflections for the (003), (006), (110) and (113) planes and wide and asymmetric reflections for the (102), (105) and (108) planes (Beres et al., 1997; Vaccari, 1998; Carja et al., 2002; Dupin et al., 2004). The interlayer distance calculated from  $d(003)$  spacing for HT70 hydrotalcite was 0.78 nm. Other authors have reported similar values for hydrotalcite-like type materials (Dupin et al., 2004; Laguna et al., 2007). X-ray diffraction also showed that HT70c collapses upon heating to 500°C, resulting in the mixed oxide MgAlO as the peaks at 43.3 and 62.9° 2 $\theta$  were clearly resolved (Laguna et al., 2007). The FTIR spectrum of the HT70c adsorbent is shown in Figure 2.8.

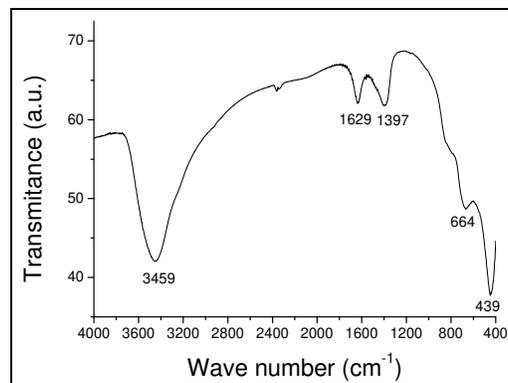


**Figure 2.6:** SEM image of the HT70c hydrotalcite.



**Figure 2.7:** Powder XRD patterns of the HT70 and HT70c hydrotalcites.

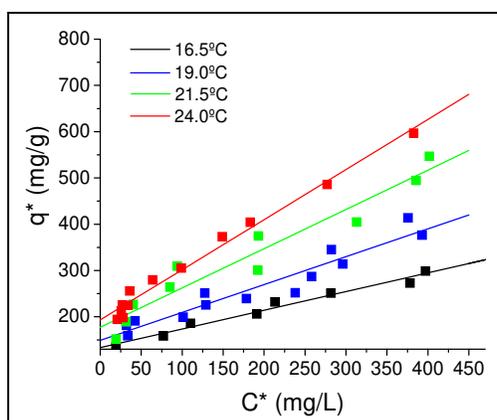
According Figure 2.8, the broad adsorption peak between 3600 and 3300  $\text{cm}^{-1}$  is due to the vibration of structural  $\text{OH}^-$  groups from the brucite-like structure H-bonding with water molecules. Peaks around 1629  $\text{cm}^{-1}$  are due to the bending of water molecules and those around 1397 and 664  $\text{cm}^{-1}$  are due to the carbonate ions. This spectrum suggests that some of the water molecules and carbonate anions are still present after calcination, probably due to the water molecules and carbon dioxide species adsorbed when the hydrotalcite is cooled in the atmosphere during the calcination process (Yang et al., 2005).



**Figure 2.8:** FTIR spectrum of the HT70c hydrotalcite.

### 2.3.4 EQUILIBRIUM

Analysis of the adsorption isotherm data is important to develop an equation which will accurately represent the results and which may be used for design purposes (Ho and McKay, 1998). The regressions of the experimental data at different temperatures are shown in Figure 2.9. According to the explained variance ( $R^2$ ) of the models, the most satisfactory fit is achieved with the linear model. The adsorption coefficients ( $k_{lin}$ ) are shown in Table 2.3. It can be seen that the higher the temperature, the higher the amount adsorbed, suggesting an endothermic behavior for CA adsorption on the HT70c adsorbent.



**Figure 2.9.** Linear regression for the experimental data of CA adsorption isotherms on the HT70c hydrotalcite according to the linear model at different temperatures.

A possible explanation for this phenomenon is a higher degree of molecule dispersion in the solution and therefore a higher interaction of CA molecules with the HT70c surface. Authors have also reported endothermic processes in anion adsorption systems using these adsorbents (Pavan et al., 1998; Yang et al., 2005; Lv et al., 2006). On the other hand, some authors have reported CA adsorption in

batch systems using the IRA 400 anion exchanger, which resulted in a decrease in the amount adsorbed with the increase in temperature (Barboza et al., 2003).

Small temperature variations led to a significant increase in the adsorption capacity, whereas the thermal sensitivity of the CA increases denaturation at higher temperatures. Hence a compromise between adsorption rate and denaturation rate must be considered to minimize loss and maximize separation efficiency.

### 2.3.5 THERMODYNAMIC MECHANISM

The thermodynamic approach can provide information on the effect of temperature on reaction kinetics. There are classic thermodynamic relationships, such as Gibbs free energy, enthalpy and entropy, which are derived from the thermodynamic principle of equilibrium ( $dG^t = 0$  at constant temperature and pressure) (Barboza et al., 2003), which can be used to gain important insight into the process. Using the adsorption coefficient  $k_{lin}$  for each temperature from the above linear model, the Gibbs free energy ( $\Delta G^\circ$ ) can be calculated according to equation 2.6 (Asouhidou et al., 2009).

$$\Delta G^0 = -RT \ln k_{lin} \quad (2.6)$$

The standard enthalpy change ( $\Delta H^\circ$ ) and entropy change ( $\Delta S^\circ$ ) of the process can be associated by the fundamental relationship expressed in equation 2.7.

$$\Delta G^0 = \Delta H^0 - T\Delta S^0 \quad (2.7)$$

Therefore, it is possible to determine a linear relationship between the equilibrium constant and temperature with the estimation of thermodynamic

parameters such as  $\Delta G^\circ$ ,  $\Delta H^\circ$  and  $\Delta S^\circ$  according to equation 2.8. This relationship is also known as van't Hoff's equation and can be used by assuming  $k_c = k_{lin}$  since  $k_c = q^*/C^*$  (Zawani et al., 2009). According to the explained variance of the linear regression ( $R^2 = 0.990$ ), there is a satisfactory fit to the experimental data and the respective parameters can be seen in Table 2.3.

$$\ln k_c = \ln k_{lin} = \frac{-\Delta H^\circ}{R} \frac{1}{T} + \frac{\Delta S^\circ}{R} \quad (2.8)$$

The calculated Gibbs free energies were:  $\Delta G^\circ = 2.100, 1.301, 0.503$  and  $-0.295$  kJ/mol for 16.5, 19.0, 21.5 and 24.0°C, respectively. According to these values, a spontaneous adsorption process, which occurs when  $\Delta G^\circ$  is negative, is noticed only for temperatures above 24.0°C. In this study, an endothermic characteristic of the process may be confirmed by the positive  $\Delta H^\circ$  values. The calculated values for enthalpy and entropy change were:  $\Delta H^\circ = 94.602$  kJ/mol and  $\Delta S^\circ = 0.319$  kJ/mol.K.

**Table 2.3:** Equilibrium and thermodynamic parameters of CA adsorption in HT70c hydrotalcite.

T (°C)	Equilibrium		Thermodynamic		
	$k_{lin}$ (L/g)	$R^2$	$\Delta G^\circ$ (kJ/mol)	$\Delta H^\circ$ (kJ/mol)	$\Delta S^\circ$ (kJ/mol.K)
16.5	0.404	0.979	2.100	94.602	0.319
19.0	0.602	0.920	1.301		
21.5	0.849	0.932	0.503		
24.0	1.083	0.984	-0.295		

The diffusion of organic solutes within porous adsorbents can be an endothermic or exothermic process in nature (Khraisheh et al., 2002). Some authors

attributed the increasing adsorption capacity to the enhanced mobility and penetration of molecules within the sorbent porous structure, overcoming the activation energy barrier and enhancing the rate of intraparticle diffusion (Asouhidou et al., 2009). Because diffusion is an endothermic process, the rate of organic solute uptake by porous solids will often increase with increasing temperature (Khraisheh et al., 2002). The positive value of  $\Delta S^\circ$  corresponds to an increase in the degree of freedom of the adsorbed CA molecules. Another possible explanation for the positive  $\Delta H^\circ$  and  $\Delta S^\circ$  is related to two processes: (i) exchange of the solvent (water) molecules previously adsorbed and (ii) adsorption of CA molecules. Each CA molecule must displace more than one molecule of water. The net result corresponds to an endothermic process, i.e., positive  $\Delta H^\circ$  and  $\Delta S^\circ$  (Khraisheh et al., 2002).

There are studies in literature reporting different thermodynamic behavior for CA adsorption ( $\Delta H^\circ = -29.150$  kJ/mol and  $\Delta S^\circ = 0.076$  kJ/mol.K), although using chemical IRA 400 anionic resin as adsorbent, which was characterized as an exothermic process (Barboza et al., 2003).

Still regarding the thermodynamic aspects, the process may also be evaluated by the limiting step of mass transfer. Several processes have been characterized as intraparticle diffusion-controlled systems because of the low  $\Delta H^\circ$  values (Khraisheh et al., 2002). Others have associated high  $\Delta H^\circ$  values ( $\Delta H^\circ > 30$  kJ/mol) to reaction-controlled processes (Ho and McKay, 1998; Lv et al., 2006). Thus, as relatively high values were found for this parameter, CA adsorption by LDH systems may be considered as a reaction-controlled process.

## 2.4 CONCLUDING REMARKS

The most favourable conditions for clavulanic acid (CA) adsorption in batch system using hydrotalcite adsorbents were determined, which included use of distilled water as solvent for CA solutions and  $\varepsilon_{st} = 15.0$  mg/mL as the solid/liquid ratio. Factorial design technique was used as a tool for estimation of hydrolyzed CA mass in adsorption assays. Experimental parameters which have the highest influence on CA hydrolysis are temperature and pH, whereas the buffer concentration has so significant effects at the studied levels. It has been shown that the calcined hydrotalcite with 70 % MgO presented a better adsorption profile. The most suitable model to fit to the experimental equilibrium data was the linear model. Increasing temperature caused an increased adsorption capacity of the hydrotalcite adsorbent, which suggests an endothermic adsorption process. The thermodynamic parameters confirmed that CA adsorption by hydrotalcite is endothermic in nature and a spontaneous process at room temperature. The system was considered as a reaction-controlled mass transport process. These results show that hydrotalcite may be an excellent alternative adsorbent for CA separation from fermentation broths.

## 2.5 ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are grateful to Sasol Germany Gmb. H. for donation of the hydrotalcites and FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) for the financial support (proc. 2008/57298-3). This work has also been supported by the Brazilian Synchrotron Light Laboratory (LNLS) / Brazilian Biosciences National Laboratory (LNBio) under proposal SEM-LV 9660.

## 2.6 REFERENCES

- ASOUHIDOU, D. D.; TRIANTAFYLLIDIS, K. S.; LAZARIDIS, N. K.; MATIS, K. A.; KIM, S. S.; PINNAVAIA, T. J. Sorption of reactive dyes from aqueous solutions by ordered hexagonal and disordered mesoporous carbons. **Micropor Mesopor Mat**, v. 117, p. 257-267, 2009.
- 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. **Biochem Eng J**, v. 14, p. 19-26, 2003.
- BERES, A.; PALINKO, I.; BERTRAND, J. C.; NAGY, J. B.; KIRICSI, I. Dehydration-rehydration behaviour of layered double hydroxides: A study by X-ray diffractometry and MAS NMR spectroscopy. **J Mol Struct**, v. 410, p. 13-16, 1997.
- BERSANETTI, P. A.; ALMEIDA, R. M. R. G.; BARBOZA, M.; ARAUJO, M. L. G.; HOKKA, C. O. Kinetic studies on clavulanic acid degradation. **Biochem Eng J**, v. 23, p. 31-36, 2005.
- BIRD, A. E.; BELLIS, J. M.; GASSON, B. C. Spectrophotometric Assay of Clavulanic Acid by Reaction with Imidazole. **Analyst**, v. 107, p. 1241-1245, 1982.
- BONINA, F. P.; GIANNOSI, M. L.; MEDICI, L.; PUGLIA, C.; SUMMA, V.; TATEO, F. Diclofenac-hydrotalcite: In vitro and in vivo release experiments. **Appl. Clay Sci.**, v. 41, p. 165-171, 2008.
- BOON, M. A.; VAN'T RIET, K.; JANSSEN, A. E. M. Enzymatic synthesis of oligosaccharides: Product removal during a kinetically controlled reaction. **Biotechnol Bioeng**, v. 70, p. 411-420, 2000.
- CAI, H.; HILLIER, A. C.; FRANKLIN, K. R.; NUNN, C. C.; WARD, M. D. Nanoscale Imaging of Molecular Adsorption. **Science**, v. 266, p. 1551-1555, 1994.
- CARJA, G.; NAKAMURA, R.; NIYAMA, H. Copper and iron substituted hydrotalcites: properties and catalyst precursors for methylamines synthesis. **Appl Catal a-Gen**, v. 236, p. 91-102, 2002.
- CHANG, Y. K.; HUANG, R. Z.; LIN, S. Y.; CHIU, S. J.; TSAI, J. C. Equilibrium study of immobilized lysozyme on the extrudate-shaped NaY zeolite. **Biochem Eng J**, v. 28, p. 1-9, 2006.

- CREPALDI, E. L.; TRONTO, J.; CARDOSO, L. P.; VALIM, J. B. Sorption of terephthalate anions by calcined and uncalcined hydrotalcite-like compounds. **Colloid Surface A**, v. 211, p. 103-114, 2002.
- CREPALDI, E. L. and VALIM, J. B. Layered double hydroxides: Structure, synthesis, properties and applications. **Quim Nova**, v. 21, p. 300-311, 1998.
- DADWHAL, M.; OSTWAL, M. M.; LIU, P. K. T.; SAHIMI, M.; TSOTSIS, T. T. Adsorption of Arsenic on Conditioned Layered Double Hydroxides: Column Experiments and Modeling. **Ind Eng Chem Res**, v. 48, p. 2076-2084, 2009.
- DUPIN, J.-C.; MARTINEZ, H.; GUIMON, C.; DUMITRIU, E.; FECHETE, I. Intercalation compounds of Mg–Al layered double hydroxides with dichlophenac: different methods of preparation and physico-chemical characterization. **Appl. Clay Sci.**, v. 27, p. 95-106, 2004.
- ELANDER, R. P. Industrial production of beta-lactam antibiotics. **Appl Microbiol Biot**, v. 61, p. 385-392, 2003.
- FORANO, C.; HIBINO, T.; LEROUX, F.; TAVIOT-GUÉHO, C. Layered Double Hydroxides. In: BERGAYA, F.; THENG, B. K. G.; LAGALY, G. **Handbook of Clay Science**, Amsterdam: Elsevier, 2006, p. 1021-1095.
- FORTE, M. and MAUGERI, F. Purification of clavulanic acid from fermentation broth using zeolites. **J Biotechnol**, v. 131, p. S191-S191, 2007.
- GOH, K. H.; LIM, T. T.; DONG, Z. Application of layered double hydroxides for removal of oxyanions: A review. **Water Res**, v. 42, p. 1343-1368, 2008.
- HERMOSÍN, M. C.; PAVLOVIC, I.; ULIBARRI, M. A.; CORNEJO, J. Hydrotalcite as sorbent for trinitrophenol: sorption capacity and mechanism. **Water Res**, v. 30, p. 171-177, 1994.
- HIBINO, T. Delamination of Layered Double Hydroxides Containing Amino Acids. **Chem. Mater.**, v. 16, p. 5482-5488, 2004.
- HO, Y. S. and MCKAY, G. Sorption of dye from aqueous solution by peat. **Chem Eng J**, v. 70, p. 115-124, 1998.
- INACIO, J.; TAVIOT-GUÉHO, C.; FORANO, C.; BESSE, J.-P. Adsorption of MCPA pesticide by MgAl-layered double hydroxides. **Appl. Clay Sci.**, v. 18, p. 255-264, 2001.

- KANG, M. J.; CHUN, K. S.; RHEE, S. W.; DO, Y. Comparison of sorption behavior of I- and TcO<sub>4</sub><sup>-</sup> on Mg/Al layered double hydroxide. **Radiochim Acta**, v. 85, p. 57-63, 1999.
- KHRAISHEH, M. A. M.; AL-DEGS, Y. S.; ALLEN, S. J.; AHMADA, M. N. Elucidation of controlling steps of reactive dye adsorption on activated carbon. **Ind. Eng. Chem. Res.**, v. 41, p. 1652-1657, 2002.
- KUHN, R. C. and MAUGERI, F. Separation of fructooligosaccharides using zeolite fixed bed columns. **J Chromatogr B**, v. 878, p. 2023-2028, 2010.
- LAGUNA, H.; LOERA, S.; IBARRA, I. A.; LIMA, E.; VERA, M. A.; LARA, V. Azoic dyes hosted on hydrotalcite-like compounds: Non-toxic hybrid pigments. **Micropor Mesopor Mat**, v. 98, p. 234-241, 2007.
- LV, L.; HE, J.; WEI, M.; DUAN, X. Kinetic Studies on Fluoride Removal by Calcined Layered Double Hydroxides. **Ind. Eng. Chem. Res.**, v. 45, p. 8623-8628, 2006.
- MANDAL, S. and MAYADEVI, S. Cellulose supported layered double hydroxides for the adsorption of fluoride from aqueous solution. **Chemosphere**, v. 72, p. 995-998, 2008.
- MORAES, C. C.; MAZUTTI, M. A.; RODRIGUES, M. I.; MAUGERI, F.; KALIL, S. J. Mathematical modeling and simulation of inulinase adsorption in expanded bed column. **J Chromatogr A**, v. 1216, p. 4395-4401, 2009.
- ORTHMAN, J.; ZHU, H. Y.; LU, G. Q. Use of anion clay hydrotalcite to remove coloured organics from aqueous solutions. **Sep Purif Technol**, v. 31, p. 53-59, 2003.
- PAVAN, P. C.; GOMES, G. D.; VALIM, J. B. Adsorption of sodium dodecyl sulfate on layered double hydroxides. **Micropor Mesopor Mat**, v. 21, p. 659-665, 1998.
- RIBEIRO, C. **Intercalação de ânion enalaprilato em hidróxido duplo lamelar recoberto com xiloglucana: estudos de liberação in vitro**. Thesis: M.Sc. 78 p. Federal University of Paraná, Curitiba-PR, 2008.
- RODRIGUES, M. I. and IEMMA, A. F. **Planejamento de experimentos e otimização de processos**. Campinas: Cárita editora, 2009.
- SANTOS, V. C.; PEREIRA, J. F. B.; HAGA, R. B.; RANGEL-YAGUI, C. O.; TEIXEIRA, J. A. C.; CONVERTI, A.; PESSOA, A. Stability of clavulanic acid under variable pH, ionic strength and temperature conditions. A new kinetic approach. **Biochem Eng J**, v. 45, p. 89-93, 2009.

- SAUDAGAR, P. S.; SURVASE, S. A.; SINGHAL, R. S. Clavulanic acid: A review. **Biotechnol Adv**, v. 26, p. 335-351, 2008.
- SEIDA, Y.; NAKANO, Y.; NAKAMURA, Y. Rapid removal of dilute lead from water by pyroaurite-like compound. **Water Res**, v. 35, p. 2341-2346, 2001.
- SILVA, C. S.; BOVAROTTI, E.; RODRIGUES, M. I.; HOKKA, C. O.; BARBOZA, M. Evaluation of the effects of the parameters involved in the purification of clavulanic acid from fermentation broth by aqueous two-phase systems. **Bioproc Biosyst Eng**, v. 32, p. 625-632, 2009.
- STANIMIROVA, T. and HIBINO, T. Ethylene glycol intercalation in MgAlCO<sub>3</sub> hydrotalcite and its low-temperature intermediate phases. **Appl Clay Sci**, v. 31, p. 65-75, 2006.
- TANG, P.; XU, X.; LIN, Y.; LI, D. Enhancement of the Thermo- and Photostability of an Anionic Dye by Intercalation in a Zinc-Aluminum Layered Double Hydroxide Host. **Ind. Eng. Chem. Res.**, v. 47, p. 2478-2483, 2008.
- VACCARI, A. Preparation and catalytic properties of cationic and anionic clays. **Catal Today**, v. 41, p. 53-71, 1998.
- YANG, L.; DADWHAL, M.; SHAHRIVARI, Z.; OSTWAL, M.; LIU, P. K. T.; SAHIMI, M.; TSOTSIS, T. T. Adsorption of arsenic on layered double hydroxides: Effect of the particle size. **Ind Eng Chem Res**, v. 45, p. 4742-4751, 2006.
- YANG, L.; SHAHRIVARI, Z.; LIU, P. K. T.; SAHIMI, M.; TSOTSIS, T. T. Removal of Trace Levels of Arsenic and Selenium from Aqueous Solutions by Calcined and Uncalcined Layered Double Hydroxides (LDH). **Ind. Eng. Chem. Res.**, v. 44, p. 6804-6815, 2005.
- YU, Y. C.; HUANG, Y. C.; LEE, T. Y. Purification of antibodies from protein mixtures and mouse ascites fluid using zeolite X. **Biotechnol Progr**, v. 14, p. 332-337, 1998.
- ZAWANI, Z.; LUQMAN, C. A.; CHOONG, T. S. Y. Equilibrium, Kinetics and Thermodynamic Studies: Adsorption of Remazol Black 5 on the Palm Kernel Shell Activated Carbon (PKS-AC). **European J. Sci. Res.**, v. 37, p. 67-76, 2009.

## CAPÍTULO 3

**Determination of equilibrium and mass-transfer parameters  
in a batch adsorption system: mathematical modeling of  
clavulanic acid adsorption in hydrotalcites**

*Artigo submetido para publicação em forma de capítulo no livro "Recent  
Developments in Biotechnology" pela editora Studium Press LLC, USA.*



**Determination of equilibrium and mass-transfer parameters in a batch adsorption system: mathematical modeling of clavulanic acid adsorption in hydrotalcites**

**Marcus Bruno Soares Forte<sup>1\*</sup>, Marcio Antonio Mazutti<sup>2</sup>, Élen Cristina L. Elias<sup>1</sup>, Maria Isabel Rodrigues<sup>1</sup> and Francisco Maugeri Filho<sup>1</sup>**

*(1) Laboratory of Bioprocess Engineering, Food Engineering Department, School of Food Engineering, University of Campinas (UNICAMP), R. Monteiro Lobato, 80, Campinas-SP, 13083-862, Brazil.*

*(2) Chemical Engineering Department, Federal University of Santa Maria, Av. Roraima, 1000, Santa Maria-RS, 97105-900, Brazil.*

**ABSTRACT:** A mathematical model was developed for the adsorption of clavulanic acid (CA) in different calcined hydrotalcites (HT30c, HT63c and HT70c) in order to evaluate the adsorption behavior in terms of mass transport. The evaluated parameters were adsorption coefficient, according to the linear equilibrium model ( $k_{lin}$ ), film coefficient (or external mass transfer coefficient) ( $k_f$ ) and effective diffusivity ( $D_{ef}$ ), estimated and optimized by the Particle Swarm Optimization (PSO) algorithm. An analysis of resistances that control the process was carried out with dimensionless numbers as the mass Biot number ( $Bi$ ) and the apparent Thiele modulus ( $\phi^{ap}$ ). Simulations were performed using the fitted  $\phi^{ap}$  to

evaluate the parameter sensitivity using factorial design as a tool. The estimated values were:  $k_{lin} = 6.32$  L/g,  $k_f = 0.33 \times 10^{-7}$  cm/s,  $D_{ef} = 4.05 \times 10^{-11}$  cm<sup>2</sup>/s,  $Bi = 5.5$  and  $\phi^{ap} = 12.0$ , for HT30c hydrotalcite;  $k_{lin} = 6.14$  L/g,  $k_f = 1.00 \times 10^{-7}$  cm/s,  $D_{ef} = 1.89 \times 10^{-11}$  cm<sup>2</sup>/s,  $Bi = 35.4$  and  $\phi^{ap} = 36.0$ , for HT63c hydrotalcite;  $k_{lin} = 6.61$  L/g,  $k_f = 0.51 \times 10^{-7}$  cm/s,  $D_{ef} = 1.77 \times 10^{-11}$  cm<sup>2</sup>/s,  $Bi = 19.1$  and  $\phi^{ap} = 38.2$ , for HT70c hydrotalcite. Factorial design and surface response analysis were shown to be effective tools for examining the parametric sensitivity. Based on the found values for  $Bi$  and  $\phi^{ap}$ , it was concluded that the process of CA adsorption in the hydrotalcites HT30c, HT63c e HT70c is mainly controlled by external mass transport.

**Key-words:** clavulanic acid, hydrotalcites, mathematical modeling, mass-transfer parameters, stirred tank reactor.

## NOMENCLATURE

$Bi$  – Biot number

$C^*$  – Equilibrium concentration of CA in liquid phase (mg/L)

$C$  – Concentration of CA in liquid phase (mg/L)

$C_0$  – Initial concentration of CA in liquid phase (mg/L)

$C_b$  – Bulk concentration of CA in liquid phase (mg/L)

$C_{exp}$  – Experimental average concentration of CA in the liquid phase (mg/L)

$C_s$  – Concentration of CA in the particle surface (mg/L)

$D_{ef}$  – Effective diffusivity (cm<sup>2</sup>/s)

$k_f$  – Film coefficient (cm/s)

$q^*$  – Equilibrium concentration of CA in the solid-phase (mg/g)

$r$  – Radial position (mm)

$R_p$  – Radius of particle (mm)

$r_q$  – Adsorption rate ( $s^{-1}$ )

$v_{obs}$  – Observed reaction rate (cm/L.min)

$V_l$  – Liquid volume (mL)

$V_s$  – Solid volume (mL)

$\epsilon_{st}$  – Fraction of solids in the reactor (mg/mL)

$\epsilon_p$  – Particle porosity

### 3.1 INTRODUCTION

Clavulanic acid (CA) is a potent inhibitor of beta-lactamases and is considered the main compound produced by the bacterium *Streptomyces clavuligerus* (Saudagar et al., 2008). This beta-lactam compound is composed of a beta-lactam ring and one oxazolidine ring (Howarth et al., 1976; Reading and Cole, 1977), as seen in Figure 3.1. Although CA is not very effective in combating pathogenic gram-positive and gram-negative bacteria (Kim et al., 2001), this biomolecule acts as a potentiator of beta-lactam antibiotics by competitive inhibition of beta-lactamases (Barboza et al., 2003).

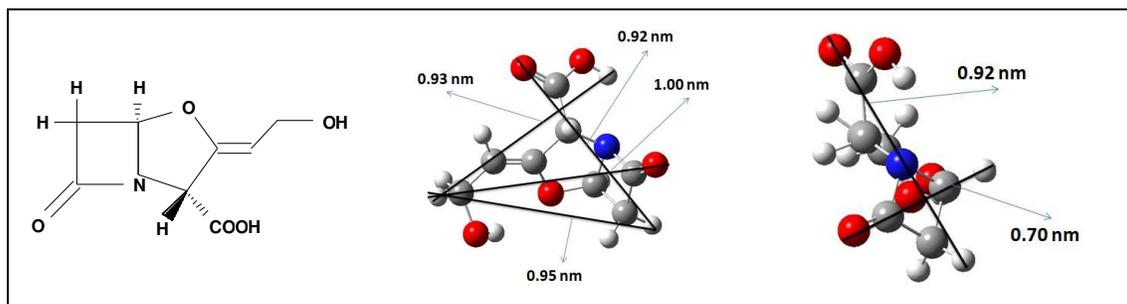


Figure 3.1: Chemical structure of clavulanic acid.

The downstream step deserves special attention in the production process of high-value biomolecules such as CA, since up to 90 % of the total production cost may be associated with this stage (Moraes et al., 2009). Regarding the use of adsorption processes in intermediate purification stages, some authors have used chemical anion exchange resins (Barboza et al., 2003; Silva et al., 2012). However, the price of these resins is relatively high which makes the process increasingly expensive. It is therefore important to study and evaluate the potential for

adsorption of CA in alternative adsorbents. The use of layered double hydroxides as adsorbents of CA may be a good alternative, since under conditions of greater stability the CA molecule has an anionic nature (Barboza et al., 2003; Bersanetti et al., 2005). In previous studies the adsorption of CA has been evaluated for a specific LDH (hydrotalcites) (Forte et al., 2012a).

The evaluation of kinetics and mass-transfer parameters has intensified in adsorption studies of organic and inorganic molecules in solid matrices (Khraisheh et al., 2002; Barboza et al., 2003; Sulak et al., 2007; Sonetaka et al., 2009b). Some methods used for mass transport parameters determinations have been developed (Guibal et al., 1998; Sonetaka et al., 2009a). Mathematical modeling and simulation, with the simultaneous parameter estimation and optimization has been very useful both on research and in the industrial sector (Moraes et al., 2009; Burkert et al., 2011). The heuristic algorithm Particle Swarm Optimization (PSO) was previously reported as good method for parameter estimation in adsorption processes for separation of enzyme in expanded-bed column (Moraes et al., 2009), batch adsorption of CA in zeolites (Forte et al., 2011a), breakthrough curves for adsorption of cephalosporin C in fixed-bed columns (Burkert et al., 2011) and separation of sugars from the reaction mixture for production of fructooligosaccharides using the X zeolite as adsorbent in stirred-tank reactor (Kuhn and Maugeri, 2010).

In this context, the aim of the present study was to model the adsorption of CA in a stirred tank reactor using different types of hydrotalcites as adsorbents, and thus to use the model as a tool for the characterization of the adsorption process based on mass transfer processes and estimated parameters.

## 3.2 METHODOLOGY

### 3.2.1 ADSORBENTS

The hydrotalcites [Mg-Al-CO<sub>3</sub>] PURAL<sup>®</sup>MG 30, PURAL<sup>®</sup>MG 63HT and PURAL<sup>®</sup>MG 70 (30, 63 and 70 % MgO composite, respectively) were kindly donated by Sasol Germany Gmb. H). Adsorbents were sieved into fractions with mesh sizes between 65 and 270 (53-212 μm) and were calcined at 500°C for 4 h.

### 3.2.2 EXPERIMENTAL DATA

Experiments were carried out in isothermal glass stirring reactors (T = 30°C) containing 100 mL of a CA solution (C<sub>0</sub> = 200 mg/L) from the pharmaceutical product Clavulin<sup>®</sup> diluted in distilled water and 3.0 g of HT30c, HT63c and HT70c hydrotalcites (ε<sub>st</sub> = 30 mg/mL).

### 3.2.3 CLAVULANIC ACID ANALYSIS

The CA concentrations were determined by spectrophotometric analysis of the derivated product from CA reaction with imidazole. The classical spectrophotometric method was used (Bird et al., 1982), with Clavulin<sup>®</sup> (GlaxoSmithKline, United Kingdom) as a standard. The analysis consists of the spectrophotometric determination of the product of reaction of CA with imidazole. It was prepared two different solutions (A and B). For solution A, it was added 5 mL of imidazole (60 g/L, pH 6.8) to 1 mL of sample, where the blank was the solution formed by mixing 5 mL of imidazole and 1 mL of distilled water. For the solution B, it was added 5 mL of distilled water to 1 mL of sample, where the blank was distilled water. The solutions were heated to 30°C for 15 min. Then, the

absorbance of the solutions A and B were measured at  $\lambda = 312$  nm in a spectrophotometer DU® 640 (Beckman Coulter™, USA). The delta absorbance of the two substances (A and B) was used to calibrate against the concentration. The relationship is linear until a CA concentration of 50 mg/L. Thus, the samples were appropriately diluted.

### 3.2.4 MATHEMATICAL MODELING

The equilibrium of CA adsorption on hydrotalcites can be described by linear model (Forte et al., 2012a):

$$q^* = k_{lin} C^* \quad (3.1)$$

where  $q^*$  is the equilibrium concentration of CA in the solid-phase,  $C^*$  is the corresponding equilibrium concentration of CA in the liquid-phase and  $k_{lin}$  is the adsorption constant.

Thus, the adsorption could be described by a differential mass balance on the solid-phase as follows (Barboza et al., 2003):

$$rq = \frac{dq}{dt} \quad (3.2)$$

The development of the mathematical model of the adsorption of CA into HT70c in a stirred tank reactor was assumed that  $V_s$  is the volume of adsorbent immersed in a volume  $V_l$  of liquid with CA dissolved at an initial concentration  $C_0$ , contained in a perfectly stirred reactor. The solute (CA) diffuses into hydrotalcites particles and is adsorbed until the equilibrium is reached. In the formulation of the model, it is assumed that the particles are spherical; CA diffusion in the solid particles follows Fick's law; diffusion is in the  $r$  direction only; adsorption takes place under isothermal conditions. The adsorbed CA is assumed to be in

equilibrium with that in the pore fluid at each radial position within the particle. The following conservation equations and boundary conditions are used to describe de CA uptake kinetics for spherical particles of radius  $R_p$  in a closed batch system. Based on the above assumptions, the adsorption process in a constant-volume stirred-tank can be described by Eq. 3.3:

$$\frac{dC_b}{dt} = -\frac{3}{R_p} \frac{V_s}{V_l} k_f (C_b - C_s) \quad (3.3)$$

where  $C_b$  is the bulk concentration of CA,  $C_s$  is the surface of the solid concentration of CA and  $k_f$  is the film coefficient and  $R_p$  is the radius of particle. The initial condition for Eq. 3.3 is:

$$t = 0 \rightarrow C_b = C_0 \quad (3.4)$$

The differential material balance inside the solid particles, on the porous surface, where adsorption takes place, is given by Eq. 3.5:

$$\frac{\partial C_i}{\partial t} = D_{ef} \left( \frac{\partial^2 C_i}{\partial r^2} + \frac{2}{r} \frac{\partial C_i}{\partial r} \right) - \frac{(1 - \varepsilon_p)}{\varepsilon_p} r q \quad (3.5)$$

where  $D_{ef}$  is the effective diffusion coefficient and  $\varepsilon_p$  is the particle porosity. If the equilibrium at the surface is considered, this equation can be reduced to Eqs. 3.6 and 3.7:

$$\frac{\partial C_i}{\partial t} = \frac{\varepsilon_p}{\varepsilon_p} \left( D_{ef} \left( \frac{\partial^2 C_i}{\partial r^2} + \frac{2}{r} \frac{\partial C_i}{\partial r} \right) - \left( \frac{(1 - \varepsilon_p)}{\varepsilon_p} \frac{\partial q_i}{\partial t} \frac{\partial C_i}{\partial C_i} \right) \right) \quad (3.6)$$

$$\left( \varepsilon_p + (1 - \varepsilon_p) \frac{\partial q_i}{\partial C_i} \right) \frac{\partial C_i}{\partial t} = \varepsilon_p D_{ef} \left( \frac{\partial^2 C_i}{\partial r^2} + \frac{2}{r} \frac{\partial C_i}{\partial r} \right) \quad (3.7)$$

The initial and boundary conditions associated with diffusion process inside the solid particles are respectively:

$$t = 0 \rightarrow C_i = q_i = 0 \quad (3.8)$$

$$r = R_p \rightarrow \frac{\partial C_i}{\partial r} = \frac{k_f}{\varepsilon_p D_{ef}} (C_b - C_s) \quad (3.9)$$

$$r = 0 \rightarrow \frac{\partial C_i}{\partial r} = 0 \quad (3.10)$$

To solve the partial differential equation (Eq. 3.7), the spatial derivatives were approximated by finite differences using equal size elements. This approximation results in a system of ordinary differential equations composed of  $n$  equations inside the solid particle plus the differential mass equation in liquid-phase (Eq. 3.3), which was solved using the LIMEX routine (Deuflhard et al., 1987). The model parameters, namely  $k_{lin}$ ,  $k_f$  and  $D_{ef}$  were estimated using a heuristic method, such as Particle Swarm Optimization (PSO).

The PSO is a heuristic algorithm based on the social behavior of collection of animals. Each individual of the swarm, called particle, remembers the best solution found by itself and by the whole swarm along the search trajectory. The PSO presents interesting characteristics along the iterations. In the initial iterations, the random character of the search is high and the particles conduct a global search over search region. As the iterations evolve, the particles concentrate around the more promising regions found during the exploration stage (Schwaab et al., 2008).

The initial value of the model parameters is very important during their estimation by deterministic methods. As the PSO is a heuristic method, the initial values were selected randomly by an appropriated routine. In heuristic methods, the range provided is tested and the optimal parameters are selected based on probability, distinct from the deterministic methods, where the initial value could determine the optimal solution (Forte et al., 2011a).

The PSO version used in this study was based on the work of Schwaab et al., which presents a detailed description of the algorithm (Schwaab et al., 2008). The search intervals for the model parameters were defined according literature (Barboza et al., 2002; Forte et al., 2011a). After a preliminary set of simulations, it was defined the best configuration of the PSO algorithm that is as following: forty particles were used for the PSO algorithm, and the inertial weight, cognition and social parameters were set at 0.7, 1.0, 1.0, respectively.

The estimation of the parameters consisted of minimizing the objective function that is based on the sum of the least squares as described by Eq. 3.11:

$$OF = \sum_1^N (C_b - C_{exp})^2 \quad (3.11)$$

The parameters were estimated for each adsorbent and, after this procedure, they were used to evaluate the mass transfer resistance in the process. The mass transfer resistances were analyzed by the Biot number (Eq. 3.12), also known as dimensionless concentration gradient in liquid film surrounding the solid particles and it is related with the external mass transfer resistance, and by the calculus of the apparent Thiele modulus (Eq. 3.13), that is related to the internal mass transfer resistance.

$$Bi = \frac{k_f R_p}{D_{ef}} \quad (3.12)$$

$$\varphi^{ap} = \frac{R_p^2}{9} \frac{v_{obs}}{D_{ef} C_0} \quad (3.13)$$

where,

$$v_{obs} = \frac{\Delta C}{\Delta t} \quad (3.14)$$

### 3.2.5 PARAMETRIC SENSITIVITY

The system was evaluated in terms of equilibrium and mass-transfer parameters, namely, linear model adsorption constant ( $k_{lin}$ ), film coefficient ( $k_f$ ) and effective diffusivity ( $D_{ef}$ ) from changes of  $\pm 50\%$ . Simulations were carried out using the validated model to perform the parametric sensitivity through an alternative methodology previously suggested (Forte et al., 2012b): the factorial design methodology was used to evaluate the effects of input changes on the process sensitivity. In this case, a central composite rotatable design (CCRD) was proposed evaluating the effects of  $k_{lin}$ ,  $k_f$  and  $D_{ef}$  on the required time to the adsorption equilibrium ( $t^*$ ), which was considered as the related time to a dimensionless concentration  $C^*/C_0 = 0.1$ . Table 3.1 shows the range values for the equilibrium and mass transport parameters.

**Table 3.1:** Factor levels (coded and real values) of the CCRD for the equilibrium and mass-transfer parameters of CA adsorption in HT63c hydrotalcite.

Parameters	- 1.68	- 1	0	+ 1	+ 1.68
$k_{lin}$ (L/g)	3.07	4.31	6.14	7.97	9.21
$k_f \times 10^7$ (cm/s)	0.50	0.70	1.00	1.30	1.50
$D_{ef} \times 10^{11}$ (cm <sup>2</sup> /s)	0.95	1.32	1.89	2.46	2.84

The central point was defined according to the standard reference process values. The design presents only one central point because that the values of repetitions would be the same since computational simulations were used

(Rodrigues and Iemma, 2012). The responses were evaluated by Statistica® 8.0 (Statsoft Inc).

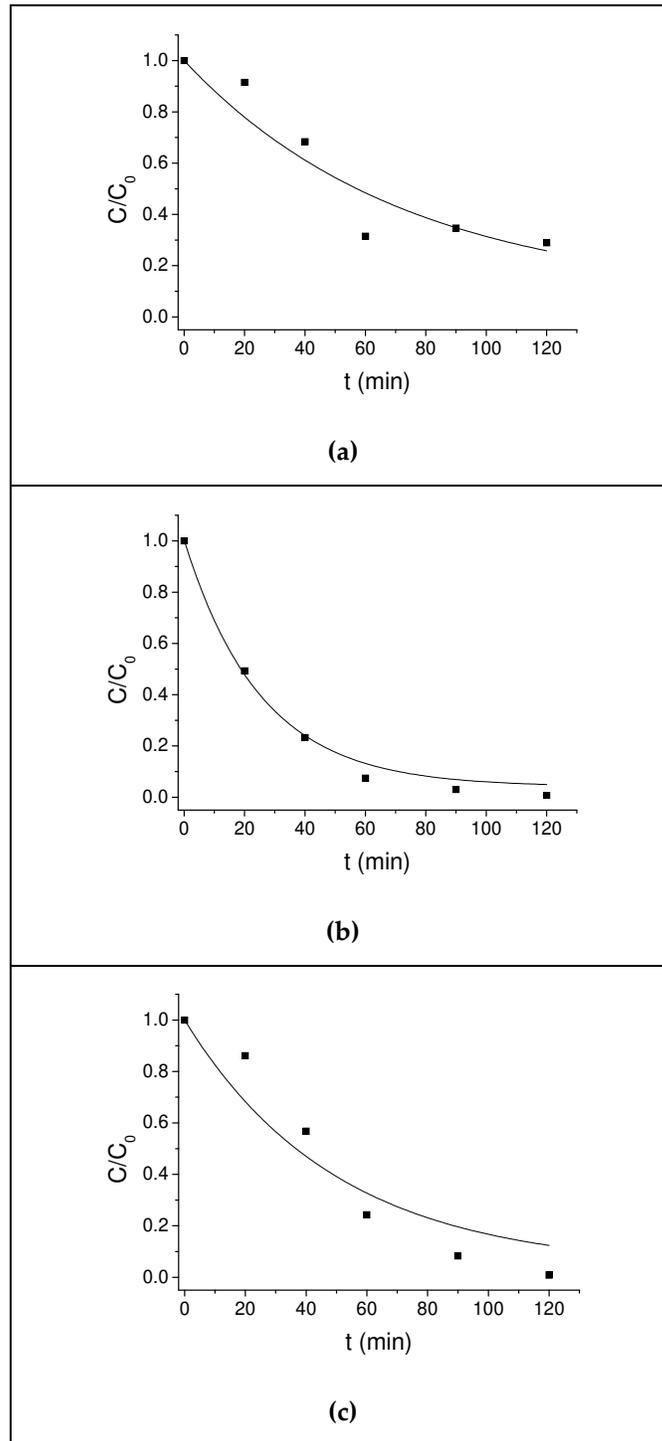
### 3.3 RESULTS AND DISCUSSION

#### 3.3.1 ADSORPTION KINETICS AND MODEL PARAMETERS

The evaluated parameters were adsorption coefficient according to the linear equilibrium model ( $k_{lin}$ ), film coefficient (or external mass transfer coefficient) ( $k_f$ ) and effective diffusivity of CA in the hydrotalcite particles ( $D_{ef}$ ).

The experimental results as well as the results predicted by the adjusted proposed model are shown in Figure 3.2 and the estimated parameter values are shown in Table 3.2. As can be observed, the hydrotalcites demonstrate high adsorption capacities for CA. The adsorbents HT63c and HT70c specifically stood out for their adsorption capacity, having adsorbed practically all CA molecules. These results show that the hydrotalcites can exhibit better efficiencies of CA adsorption when compared to other adsorbents (Barboza et al., 2002; Forte et al., 2011b). Despite the similarity of the capacity at equilibrium, the adsorbent HT63c exhibits a more favorable kinetic profile than HT70c, which can be confirmed by an analysis of the estimated parameters.

The initial parameter values of the model are very important for a successful parameter value estimating by deterministic methods and can determine the optimal solution. In heuristic methods on the other hand, the given interval and optimized parameters are selected based on probability. Because PSO is a heuristic method, the initial values, could be selected randomly using an appropriate algorithm.



**Figure 3.2:** Adsorption of clavulanic acid (CA) in the different hydrotalcites: (a) HT30c; (b) HT63c; (c) HT70c. Symbols represent experimental data and the curves are the model predictions with the optimized parameters.

**Table 3.2:** Optimized equilibrium and mass-transfer parameters for CA adsorption in the different types of hydrotalcites.

<b>Adsorbent</b>	<b><math>k_{lin}</math> (L/g)</b>	<b><math>k_f \times 10^7</math> (cm/s)</b>	<b><math>D_{ef} \times 10^{11}</math> (cm<sup>2</sup>/s)</b>	<b>Bi</b>	<b><math>\phi^{ap}</math></b>	<b><math>V_{obs}</math> (mg/L.min)</b>
HT30c	6.32	0.33	4.05	5.5	12.0	1.48
HT63c	6.14	1.00	1.89	35.4	36.0	2.07
HT70c	6.61	0.51	1.77	19.1	38.2	2.07

Good agreement among experimental and predicted data was obtained especially for the adsorbent HT63c. In general, heterogenic systems with reactions taking place inside dispersed solid particles present external mass transport problems (due to the formation of a stagnant liquid layer) and the internal mass transfer (related to the diffusivity of the adsorbate and the pore tortuosity). This mechanism can include: molecular diffusion of the compound through the liquid layer around the particle; diffusion from the external layer to the particle surface; migration within the adsorbent by diffusion through its pores; capture of the adsorbent by either chemisorption, physisorption, ion exchange or complexation (Khraisheh et al., 2002).

The found  $k_{lin}$  values are in agreement with the literature. In previous studies, values around 1.1 g/L have been reported for hydrotalcite HT70c, although a smaller solid fraction was used ( $\epsilon_{st} = 15$  mg/mL) and at temperature of 24°C (Forte et al., 2012a). For parameters  $k_f$  and  $D_{ef}$ , values in the magnitudes of  $10^{-7}$  cm/s and  $10^{-11}$  cm<sup>2</sup>/s, respectively, were found. The transport parameters ( $k_f$  and  $D_{ef}$ ) are specific for each type of adsorbent/adsorbate system and depend directly on the

type of interaction between them, as well as the kinetic and hydrodynamic profile of the process. As such, each system can be characterized differently according to these parameters. Additionally, some authors studied the adsorption of CA in ion exchange resins (Amberlite IRA 400) and found out  $k_f$  and  $D_{ef}$  values in the magnitudes of  $10^{-2}$  cm/s and  $10^{-5}$  cm<sup>2</sup>/s, respectively (Barboza et al., 2002; Barboza et al., 2003). In studies of adsorption of the dye astrazon yellow by wheat bran, values of  $k_f$  and  $D_{ef}$  were estimated in the orders of magnitude of  $10^{-5}$  cm/s and  $10^{-11}$  cm<sup>2</sup>/s respectively (Sulak et al., 2007). For adsorption of phenol in active carbon, values for  $k_f$  varying from  $10^{-5}$  to  $10^{-2}$  cm/s have been found and for  $D_{ef}$  varying from  $10^{-10}$  to  $10^{-7}$  cm<sup>2</sup>/s (Sonetaka et al., 2009b). Although in each of these studies adsorption systems similar to this present work were used, direct comparisons of those results with the ones of the present work can lead to dubious or erroneous conclusions. It is therefore important to evaluate the process in a broader view with respect to mass transport.

A quick and sufficiently effective way to gain control over the regulatory resistances in the transport process is the analysis of dimensionless numbers, as the Biot mass number ( $Bi$ ), also known as the dimensionless concentration gradient in the film and the apparent Thiele module ( $\phi^{ap}$ ) (Eqs. 3.12 and 3.13).

This approach can be commonly found in adsorption literature (Guibal et al., 1998; Barboza et al., 2002; Khraisheh et al., 2002; Barboza et al., 2003; Sulak et al., 2007; Sonetaka et al., 2009b). Some adsorption processes are controlled by external mass transport, while others by intraparticle diffusivity. However, both mechanisms can often be limiting factors of equivalent importance. A method has been proposed to determine simultaneously both  $k_f$  e  $D_{ef}$  for phenol adsorption curves in active carbon (Sonetaka et al., 2009a). The authors concluded that for the studied system,  $Bi < 0.5$  and  $Bi > 200$  are intervals where, respectively, external

mass transfer and intraparticle diffusion are limiting. In the interval  $0.5 < Bi < 200$ , both mechanisms regulate the adsorption. (Sulak et al., 2007) reported that the removal of a dye (astrazon yellow) by adsorption in wheat bran using a batch system depended on both external mass transfer rate and intraparticle diffusion, and concluded that the latter dominantly controlled the adsorption kinetics, based on the low values of  $D_{ef}$  ( $10^{-11}$  cm<sup>2</sup>/s) and consequently high values of  $Bi$  ( $>100$ ). (Khraisheh et al., 2002) elucidated the limiting steps in the adsorption process of a reactive dye by active carbon in a batch system, where high values of  $k_f$  were found when compared to  $D_{ef}$ , i.e.  $10^{-2}$  cm/s and  $10^{-7}$  cm<sup>2</sup>/s, respectively, and consequently high values for  $Bi$  ( $>100$ ), concluding that the process as a whole was controlled by intraparticle diffusion, although commenting that the slow kinetic behavior is indicative of a process that is controlled by both external and internal transport. Usually,  $\phi^{ap} < 0.3$  indicates a rate limitation by the adsorption step (intraparticle diffusion) and  $\phi^{ap} > 3.0$  a limitation by external mass transfer (Barboza et al., 2002).

Based on the values of  $Bi$  and  $\phi^{ap}$  found in this present work ( $Bi < 100$  and  $\phi^{ap} > 3.0$ ), it is possible to infer that the CA adsorption process in hydrotalcites HT30c, HT63c and HT70c is primarily limited by external mass transport.

### 3.3.2 SENSITIVITY ANALYSIS

The sensitivity analysis was carried out using the HT63c hydrotalcite model since it demonstrated a better fit and the highest values for  $Bi$  and  $v_{obs}$ . The different levels and actual values assigned for  $k_{lin}$ ,  $k_f$  and  $D_{ef}$  were presented in Table 3.1. The results for equilibrium time ( $t^*$ ), according to the CCRD, to evaluate

the effects of mass-transfer parameters on the process sensitivity using, alternatively, factorial design can be seen in Table 3.3.

**Table 3.3:** Data for the CCRD with coded input parameters values and response (output variable) equilibrium time ( $t^*$ ) for mass-transfer parameters of CA adsorption in HT63c hydrotalcite.

Run	$k_{lin}$ (L/g)	$k_f$ ( $10^{-7}$ cm/s)	$D_{ef}$ ( $10^{-11}$ cm <sup>2</sup> /s)	$t^*$ (min)
1	-1 (4.31)	-1 (0.70)	-1 (1.32)	101
2	1 (7.97)	-1 (0.70)	-1 (1.32)	95
3	-1 (4.31)	1 (1.30)	-1 (1.32)	55
4	1 (7.97)	1 (1.30)	-1 (1.32)	51
5	-1 (4.31)	-1 (0.70)	1 (2.46)	122
6	1 (7.97)	-1 (0.70)	1 (2.46)	102
7	-1 (4.31)	1 (1.30)	1 (2.46)	66
8	1 (7.97)	1 (1.30)	1 (2.46)	56
9	-1.68 (3.07)	0 (1.00)	0 (1.89)	87
10	1.68 (9.21)	0 (1.00)	0 (1.89)	68
11	0 (6.14)	-1.68 (0.50)	0 (1.89)	142
12	0 (6.14)	1.68 (1.50)	0 (1.89)	48
13	0 (6.14)	0 (1.00)	-1.68 (0.95)	66
14	0 (6.14)	0 (1.00)	1.68 (2.84)	79
15	0 (6.14)	0 (1.00)	0 (1.89)	72

Regarding the equilibrium time, the coded model was found by regression analysis of the equilibrium and the mass-transfer parameters, considering the significant terms by the hypothesis test at 95 % of confidence ( $p < 0.05$ ) (Rodrigues and Iemma, 2012) is given by Eq. 3.15:

$$t^* = 74.1 - 5.3 k - 25.6 k_f + 7.2 k_f^2 + 4.8 D_{ef} \quad (3.15)$$

This equation is a coded reduced model and, consequently, can only be used with coded parameters, as expressed in Table 3.1. Through the regression coefficients, it is possible to verify that  $t^*$  is more influenced by the  $k_f$  parameter than by others. The analysis of variance (ANOVA) was performed for model validation as shown in Table 3.4. The ANOVA consists of classifying and cross classifying statistical results and testing whether the averages of a specified classification differ significantly. This was carried out with the Fisher's statistical test for the analysis of variance.

**Table 3.4:** ANOVA of CCRD models for equilibrium and mass-transfer parameters: explained variations ( $R^2$ ), calculated F ( $F_{calc}$ ) and the listed values for 5 % significance ( $F_{list}$ ).

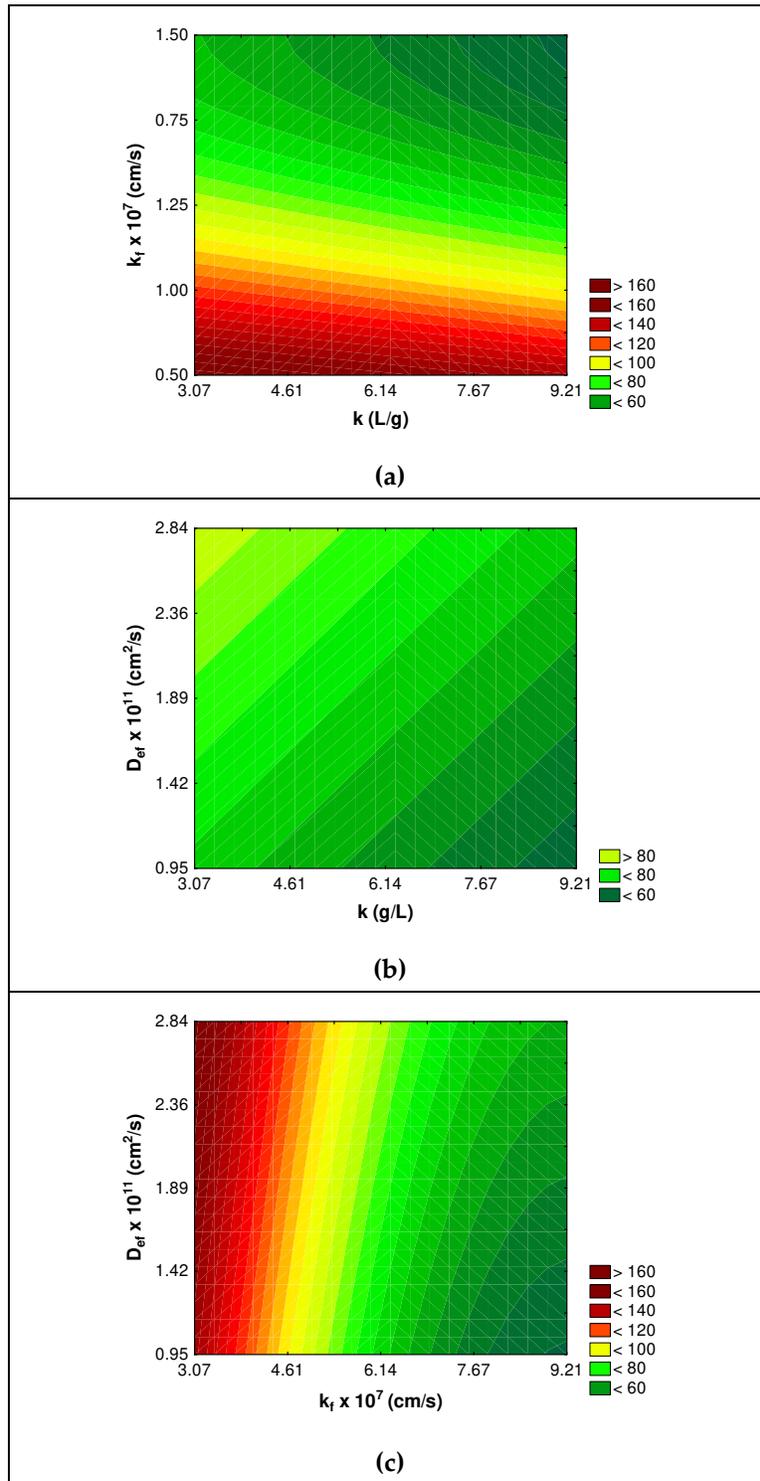
Source of variation	Sum of squares	Degrees of freedom	Mean square (MS)	$F_{calc} = \frac{MS_{Regression}}{MS_{Residues}}$
Regression	10277.6	4	2569.4	135.4
Residues	189.8	10	19.0	
Total	10467.3	14		

$R^2 = 0.982$ ;  $F_{list}(4, 10, 0.5) = 3.5$ .

The F value is the ratio of the mean square due to regression and the mean square due to error. The calculated F was about 40 times higher than the listed F value. The explained variation of the model ( $R^2 = 0.982$ ) suggested that the fitted model could explain 98.2 % of the total variation. This indicates a satisfactory representation of the process by the model (Rodrigues and Iemma, 2012).

Figure 3.3 is built using Eq. 3.15, and represents the effect of the equilibrium and mass-transfer parameters ( $k_{lin}$ ,  $k_f$  and  $D_{ef}$ ) in the equilibrium time. It is evident that the process is more influenced by the transport parameters than the equilibrium one. This phenomenon can be observed by the results of the adsorption kinetics (Figure 3.2 and Table 3.2), where small variations for this parameter are related to different adsorption profiles. For a wide range of mass-transfer parameters it is possible to obtain satisfactory values for equilibrium time, considered to be around 50 - 70 minutes. On a process viewpoint, considering the  $D_{ef}$  standard reference value, there is a wide range of  $k_f$  in which the equilibrium time is around 70 minutes.

It is important to verify that all the runs which use higher  $k_f$  values presented low equilibrium time compared with reference condition ( $t^* < 70$  min). In practice, the film coefficient can be easily changed, by increasing the agitation of the reaction mixture by particle size modification, both alternatives being industrially possible, while the decreasing in the internal mass-transfer resistance is more complicated, since it requires, for example, a change in the process temperature or the use of adsorbents with different properties. Therefore, it is convenient to have a fixe value for  $D_{ef}$ , and suitable changes made on  $k_f$  to meet the process requirements. Other authors have observed a reduction in the equilibrium time by  $k_f$  increases (Guibal et al., 1998; Sonetaka et al., 2009b).



**Figure 3.3:** Profile curves for equilibrium time ( $t^*$ ) of clavulanic acid adsorption as a function of equilibrium and mass-transfer parameters: adsorption constant ( $k_{lim}$ ), film coefficient ( $k_f$ ) and effective diffusivity ( $D_{eff}$ ).

### 3.4 CONCLUSIONS

In this study, a mathematical model was made for the adsorption of clavulanic acid (CA) in different hydrotalcites, with concurrent estimation and optimization of the process parameters  $k_{lin}$ ,  $k_f$  and  $D_{ef}$  using a PSO algorithm. The evaluated hydrotalcites showed good adsorption capacities. Regarding the mass transfer dynamics, the process was considered to be controlled by external mass transfer. This consideration was confirmed by a parametric sensitivity analysis, where a significantly greater influence was found than for intraparticle diffusion with regard to the pellicle coefficient. These results show that hydrotalcites can be an excellent alternative as adsorbent for separation processes of CA from fermentation media.

### 3.5 ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are grateful to Sasol GmbH (Germany) for donation of the hydrotalcites and FAPESP (State of São Paulo Research Foundation) for financial support (Grant N° 2008/57298-3).

### 3.6 REFERENCES

- BARBOZA, M.; ALMEIDA, R. M. R. G.; HOKKA, C. O. Intrinsic kinetic parameters of clavulanic acid adsorption by ion-exchange chromatography. **Ind Eng Chem Res**, v. 41, p. 5789-5793, 2002.
- 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. **Biochem Eng J**, v. 14, p. 19-26, 2003.
- BERSANETTI, P. A.; ALMEIDA, R. M. R. G.; BARBOZA, M.; ARAUJO, M. L. G.; HOKKA, C. O. Kinetic studies on clavulanic acid degradation. **Biochem Eng J**, v. 23, p. 31-36, 2005.

- BIRD, A. E.; BELLIS, J. M.; GASSON, B. C. Spectrophotometric Assay of Clavulanic Acid by Reaction with Imidazole. **Analyst**, v. 107, p. 1241-1245, 1982.
- BURKERT, C. A. V.; BARBOSA, G. N. O.; MAZUTTI, M. A.; MAUGERI, F. Mathematical modeling and experimental breakthrough curves of cephalosporin C adsorption in a fixed-bed column. **Process Biochem**, v. 46, p. 1270-1277, 2011.
- DEUFLHARD, P.; HAIRER, E.; ZUGCK, J. One-Step and Extrapolation Methods for Differential-Algebraic Systems. **Numer Math**, v. 51, p. 501-516, 1987.
- FORTE, M. B. S.; ELIAS, E. C. L.; PASTORE, H. O.; MAUGERI, F.; RODRIGUES, M. I. Evaluation of Clavulanic Acid Adsorption in MgAl-layered Double Hydroxides: Kinetic, Equilibrium and Thermodynamic Studies. **Adsorpt Sci Technol**, v. 30, p. 65-80, 2012a.
- FORTE, M. B. S.; MAZUTTI, M. A.; MAUGERI FILHO, F.; RODRIGUES, M. I. Evaluation of kinetic and mass transfer parameters for adsorption of clavulanic acid into natural and synthetic zeolites. **Biotechnol. Bioproc. E.**, v. 16, p. 1223-1230, 2011a.
- FORTE, M. B. S.; MAZUTTI, M. A.; MAUGERI FILHO, F.; RODRIGUES, M. I. Comparative studies on parametric sensitivity analyses using conventional and factorial design methodologies: mathematical modelling of clavulanic acid adsorption on zeolites. **J. Chem. Technol. Biotechnol.**, v. 87, p. 1715–1722, 2012b.
- FORTE, M. B. S.; RODRIGUES, M. I.; MAUGERI FILHO, F. Clavulanic acid adsorption studies in zeolites. **Adsorpt. Sci. Technol.**, v. 29, p. 391-404, 2011b.
- GUIBAL, E.; MILOT, C.; TOBIN, J. M. Metal-Anion Sorption by Chitosan Beads: Equilibrium and Kinetic Studies. **Ind. Eng. Chem. Res.**, v. 37, p. 1454-1463, 1998.
- HOWARTH, T. T.; BROWN, A. G.; KING, T. J. Clavulanic Acid, a Novel Beta-Lactam Isolated from Streptomyces-Clavuligerus - X-Ray Crystal-Structure Analysis. **J Chem Soc Chem Comm**, v. p. 266-267, 1976.
- KHRAISHEH, M. A. M.; AL-DEGS, Y. S.; ALLEN, S. J.; AHMADA, M. N. Elucidation of controlling steps of reactive dye adsorption on activated carbon. **Ind. Eng. Chem. Res.**, v. 41, p. 1652-1657, 2002.

- KIM, I. C.; KIM, C. H.; HONG, S. I.; KIM, S. W. Fed-batch cultivation for the production of clavulanic acid by an immobilized *Streptomyces clavuligerus* mutant. **World J Microb Biot**, v. 17, p. 869-872, 2001.
- KUHN, R. C. and MAUGERI, F. Selection of Adsorbents and Determination of Parameters for the Separation of Glucose, Fructose, Sucrose and Fructooligosaccharides. **Int J Food Eng**, v. 6, p. 2010.
- MORAES, C. C.; MAZUTTI, M. A.; RODRIGUES, M. I.; MAUGERI, F.; KALIL, S. J. Mathematical modeling and simulation of inulinase adsorption in expanded bed column. **J Chromatogr A**, v. 1216, p. 4395-4401, 2009.
- READING, C. and COLE, M. Clavulanic Acid - Beta-Lactamase-Inhibiting Beta-Lactam from *Streptomyces-Clavuligerus*. **Antimicrob Agents Ch**, v. 11, p. 852-857, 1977.
- RODRIGUES, M. I. and IEMMA, A. F. **Experimental Design and Process Optimization**. Campinas: Cárita, 2012.
- SAUDAGAR, P. S.; SURVASE, S. A.; SINGHAL, R. S. Clavulanic acid: A review. **Biotechnol Adv**, v. 26, p. 335-351, 2008.
- SCHWAAB, M.; BISCAIA, E. C.; MONTEIRO, J. L.; PINTO, J. C. Nonlinear parameter estimation through particle swarm optimization. **Chem Eng Sci**, v. 63, p. 1542-1552, 2008.
- SILVA, C. S.; CUEL, M. F.; BARRETO, V. O.; KWONG, W. H.; HOKKA, C. O.; BARBOZA, M. Separation of clavulanic acid from fermented broth of amino acids by an aqueous two-phase system and ion-exchange adsorption. **New Biotechnol**, v. 29, p. 428-431, 2012.
- SONETAKA, N.; FAN, H. J.; KOBAYASHI, S.; CHANG, H. N.; FURUYA, E. Simultaneous determination of intraparticle diffusivity and liquid film mass transfer coefficient from a single-component adsorption uptake curve. **J Hazard Mater**, v. 164, p. 1447-1451, 2009a.
- SONETAKA, N.; FAN, H. J.; KOBAYASHI, S.; SU, Y. C.; FURUYA, E. Characterization of adsorption uptake curves for both intraparticle diffusion and liquid film mass transfer controlling systems. **J Hazard Mater**, v. 165, p. 232-239, 2009b.
- SULAK, M. T.; DEMIRBAS, E.; KOBYA, M. Removal of Astrazon Yellow 7GL from aqueous solutions by adsorption onto wheat bran. **Bioresour Technol**, v. 98, p. 2590-2598, 2007.



# CAPÍTULO 4

## **Intercalation and adsorption of clavulanic acid in layered double hydroxides**

*Artigo submetido para publicação no número especial "Advances in  
bioseparations for food and bioprocessing" do periódico "Food and  
Bioproducts Processing" pela editora Elsevier.*



## Intercalation and adsorption of clavulanic acid in layered double hydroxides

Marcus Bruno Soares Forte<sup>1\*</sup>, Christine Taviot-Guého<sup>2</sup>, Fabrice Leroux<sup>2</sup>,  
Maria Isabel Rodrigues<sup>1</sup> and Francisco Maugeri Filho<sup>1</sup>

(1) *Laboratory of Bioprocess Engineering, Food Engineering Department, School of Food Engineering, University of Campinas (UNICAMP), R. Monteiro Lobato, 80, Campinas-SP, 13083-862, Brazil.*

(2) *Clermont Université, Université Blaise Pascal, Institut de Chimie de Clermont-Ferrand, BP 10448, F-63000 CLERMONT-FERRAND; CNRS, UMR 6296, ICCF, F-63171 AUBIERE*

**ABSTRACT:** The adsorption of clavulanic acid (CA), an important inhibitor of  $\beta$ -lactamase enzymes, is here addressed using Layered double Hydroxides (LDH) as adsorbing material. Different LDH compositions have been investigated:  $Zn_2Cr-Cl$ ,  $Zn_2Cr-NO_3$ ,  $Zn_2Al-NO_3$  and  $Mg_2Al-NO_3$ .  $Zn_2Cr-CA$  hybrid LDH assemblies were prepared through coprecipitation method to evaluate the affinity between the CA molecule and the interlayer sites. Experiments were carried out using two different sources of CA, i.e. the pharmaceutical product Clavulin<sup>®</sup> and Clavulanate:Avicel (1:1). The resulting inorganic-organic “sandwich” structure was characterized by a combination of techniques showing an expansion of the layered structure from

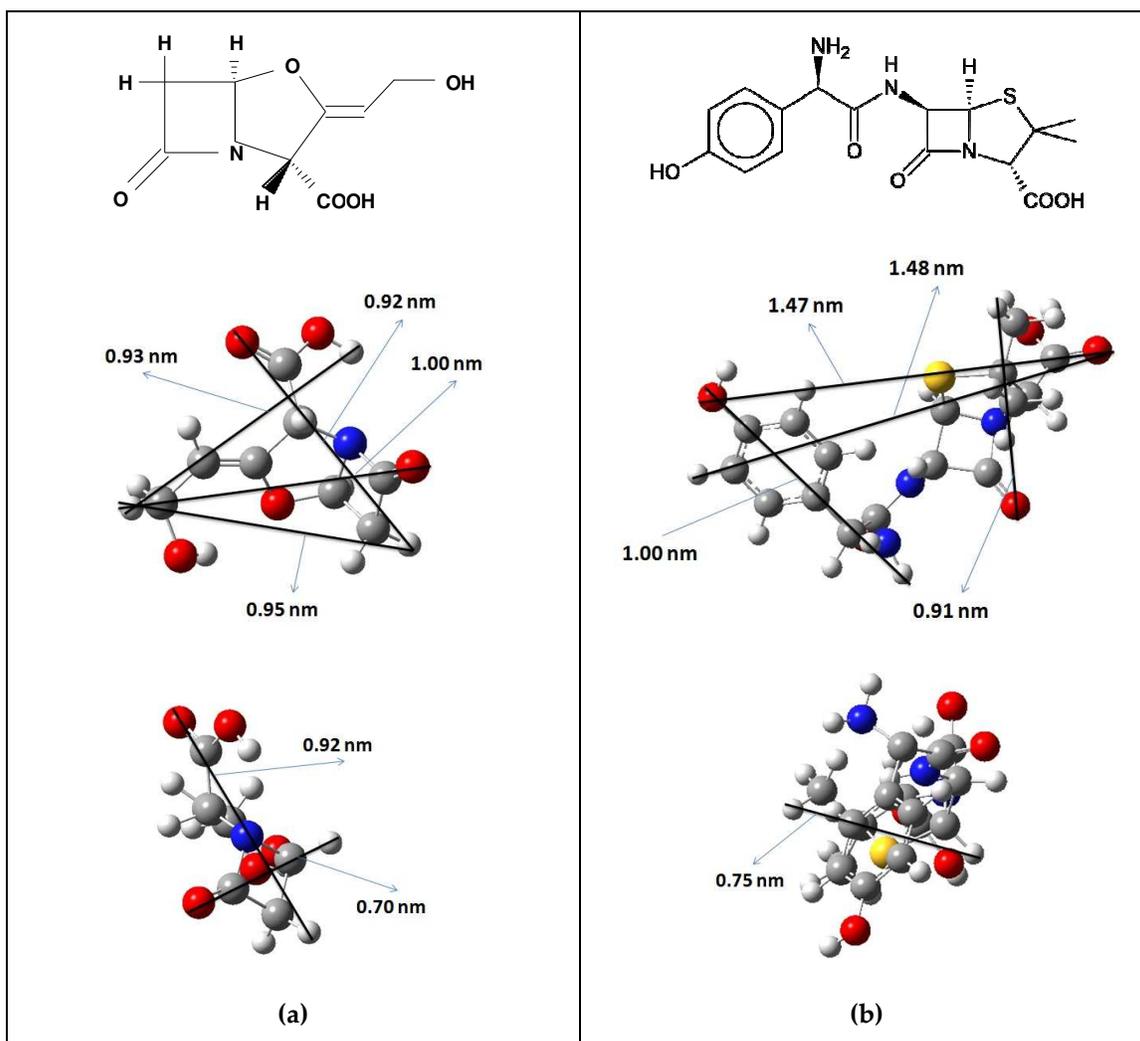
0.78 nm to values between 2.30 and 2.60 nm upon CA intercalation; a molecular sieve role of LDH host is also pointed out. Isotherms studies were carried out to evaluate the adsorption capacity of LDH towards CA in presence of contaminants such as amino acids. The *Freundlich* adsorption model was found to fit the data well and indicating relatively large adsorption capacity, as high as 73.63, 128.76 and 229.62  $\text{mg}^{1-n}\text{L}^n\text{g}^{-1}$  at 20, 30 and 35°C, respectively. Besides, the adsorption of CA is classified as an endothermic and spontaneous process with the following calculated thermodynamic parameters:  $\Delta H^\circ = 20.516$  kJ/mol,  $\Delta S^\circ = 0.081$  kJ/mol.K and  $\Delta G^\circ = -3.271, -4.082, -4.488$  kJ/mol for 20, 30 and 35°C, respectively. Particularly, the adsorption of CA onto  $\text{Zn}_2\text{Cr-NO}_3$  is a favorable process thus allowing us to envisage the use of LDH in CA biomolecule separation.

**Key-words:** clavulanic acid; layered double hydroxides; adsorption; intercalation; thermodynamic parameters.

## 4.1 INTRODUCTION

$\beta$ -lactamases enzymes produced by pathogenic bacteria are known to hydrolyze  $\beta$ -lactam rings of antibiotics such as penicillin and cephalosporin by a defensive mechanism. An effective strategy for overcoming  $\beta$ -lactamase resistance is to combine  $\beta$ -lactam antibiotics with an inhibitor of one or more hydrolytic enzymes (Maiti et al., 1998). Produced by the bacterium *Streptomyces clavuligerus*, clavulanic acid (CA) (Figure 4.1) is today considered as a potent inhibitor of  $\beta$ -lactamases (Saudagar et al., 2008). Its chemical backbone is composed of a  $\beta$ -lactam ring and an oxazolidine ring (Howarth et al., 1976; Reading and Cole, 1977) (Figure 4.1). Even the CA biomolecule is not highly effective against pathogenic gram-positive and -negative bacteria (Kim et al., 2001), it acts as a potentiator of  $\beta$ -lactam antibiotics through a competitive inhibition of  $\beta$ -lactamases (Barboza et al., 2003).

To produce the biomolecule CA, the purification step after fermentation is highly costly and requires filtration, then extraction stages involving liquid-liquid extraction followed by adsorption processes (Silva et al., 2012). All these steps result in low yield due to lack of highly hydrophobic groups (Mayer et al., 1996) and the high instability of the molecule mainly as a function of the temperature and pH (Bersanetti et al., 2005; Forte et al., 2012). It is economically important to increase the yield as well as to use less expensive anion exchange resins during the intermediate purification stages (Barboza et al., 2003; Silva et al., 2012).



**Figure 4.1:** Chemical structure and dimensional analysis of (a) clavulanic acid (CA) and (b) amoxicillin (AM).

In the quest of alternative adsorbents, Layered Double Hydroxides (LDH) composed of positively charged metal hydroxide layers of brucite type appear as relevant non-silicate candidates (Newman, 1987; Forano et al., 2006). Indeed LDH host structure is able to accommodate within its interlayer domain a large variety of organic and inorganic anionic species by intercalation process as well as onto its platelets surface by adsorption. This includes arsenate, selenate and fluoride

anions (Yang et al., 2005; Lv et al., 2006) as well as organic anions such as amino acids, succinate, tartrate, porphyrin, collagen, polymers, pigments, diclofenac, DNA and herbicides (Choy et al., 1999; Inacio et al., 2001; Dupin et al., 2004; Hibino, 2004; Leroux et al., 2004; Feng et al., 2006; Bonina et al., 2008; Sun et al., 2008; Tang et al., 2008; Marangoni et al., 2009; Taviot-Guého et al., 2011).

Since CA molecule is chemically more stable in its anionic form (Barboza et al., 2003; Bersanetti et al., 2005), LDH framework may be considered as a promising adsorbent, all the more so that the dominant contaminants in the pre-purified fermentation broth of CA are amino acids (tyrosine, proline, lysine and histidine) bearing positive charge at the used pH values (Silva et al., 2012). Therefore, LDH may act as a selective adsorbent of CA towards such other biomolecules. The adsorption of CA onto MgAl-LDH materials was previously evaluated (Forte et al., 2012), the focus is here to determine the thermo-dynamical factors of its affinity as well as to synthesize and characterize new CA-LDH bio-hybrid containers that may subsequently deliver the biomolecule. The Zn<sub>2</sub>Cr-LDH composition was selected in this study, due to its stability with low pH compatible and with that of CA molecule. The synthesized hybrids were analyzed by powder X-ray diffraction (PXRD), Fourier transform IR spectrometry (FTIR), thermogravimetric analysis (TGA) and nuclear magnetic resonance (NMR).

## 4.2 METHODOLOGY

### 4.2.1 MATERIALS

Mg(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, Zn(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, Cr(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>·9H<sub>2</sub>O, Al(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>·9H<sub>2</sub>O, NaOH (Acros), Clavulin<sup>®</sup> (GlaxoSmithKline, United Kingdom), Clavulanate:Avicel

product (1:1) (Molekula Limited – Biomolekula, United Kingdom), amoxicillin (AM) (Sigma-Aldrich), imidazole (Sigma-Aldrich).

#### 4.2.2 SYNTHESSES OF LDH ADSORBENTS AND Zn<sub>2</sub>Cr-CA HYBRID ASSEMBLIES

The samples were prepared using the coprecipitation method at constant pH and room temperature. The salt solution composed of di and trivalent cations was added dropwise into a reactor containing a solution of the anion to be intercalated; the pH is maintained constant all along by the addition of an alkaline solution (NaOH) (Troutier-Thuilliez et al., 2009).

Hence, to obtain the Zn<sub>2</sub>Cr-Cl, Zn<sub>2</sub>Cr-NO<sub>3</sub>, Zn<sub>2</sub>Al-NO<sub>3</sub> and Mg<sub>2</sub>Al-NO<sub>3</sub> phases, mixed salt solutions of ZnCl<sub>2</sub> and CrCl<sub>3</sub> with a Zn/Cr molar ratio R of 2, as well as M<sup>2+</sup>(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (M<sup>2+</sup> : Zn or Mg) and M<sup>3+</sup>(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub> (M<sup>3+</sup> : Cr or Al) with M<sup>2+</sup>/ M<sup>3+</sup> ratio = 2 were used with a final concentration of 0.1 M. The different pH values were controlled by the addition of NaOH (0.2 M): Zn<sub>2</sub>Cr-Cl (pH = 6.5), Zn<sub>2</sub>Cr-NO<sub>3</sub> (pH = 6.5), Zn<sub>2</sub>Al-NO<sub>3</sub> (pH = 7.5) and Mg<sub>2</sub>Al-NO<sub>3</sub> (pH = 9.5). The syntheses were conducted under nitrogen atmosphere (continuous flux) to avoid CO<sub>2</sub> contamination and using decarbonated water. After approximately 24 h of ageing, which is sufficient time for the formation and stabilization of the LDH, the suspensions were centrifuged, washed three times with water and finally dried in an oven at 30°C.

Synthesis of CA containing Zn<sub>2</sub>Cr-LDH was performed (to evaluate the affinity between the CA molecule and the interlayer sites) as described above in presence of CA molecule dissolved in the reactor prior to salt solution addition and representing an excess of 5 or 10 over the amount of Cr<sup>3+</sup> cations: n<sub>CA</sub> = (5 or 10) x

$\text{Cr}^{3+}$ . Owing to the low chemical stability of CA, the additions were carried at  $\text{pH} = 6.5$  and two different temperatures were tested, cold and ambient temperatures. Furthermore, two different sources of CA were used, either Clavulin<sup>®</sup> or Clavulanate:Avicel mixture, leading respectively to hybrid HBD1 or HBD2 (Table 4.1). The phase intercalated with amoxicillin ( $\text{Zn}_2\text{Cr-AM}$ ) were also performed as described for CA, with presence of AM molecule (Sigma-Aldrich) and representing an excess of 5 over the amount of  $\text{Cr}^{3+}$  cations; this reference material is important for understanding the synthesis with Clavulin<sup>®</sup> since this pharmaceutical product is a combination between CA and the antibiotic AM.

**Table 4.1:** Synthesis conditions for LDH adsorbents and LDH hybrid assemblies from source 1 (HBD1) and source 2 (HBD2) by the coprecipitation method.

Synthesis		Phase	Excess	Temperature	003 (degrees)	d(003) (nm)
S11		$\text{Zn}_2\text{Cr-Cl}$	-	Ambient	11.40	0.78
Source 1	S12	HBD1a	5	Ambient	4.24	2.08
	S13	HBD1b	5	Cold	4.53	2.00
Source 2	S35	HBD2a	5	Ambient	3.42	2.60
	S36	HBD2b	10	Ambient	3.90	2.30
S34		$\text{Zn}_2\text{Cr-AM}$	5	Ambient	5.12	1.73

#### 4.2.3 CHARACTERIZATION OF ADSORBENTS AND HYDRID ASSEMBLIES

The PXRD patterns were obtained using a Siemens D501 diffractometer equipped with a  $\text{CuK}\alpha$  anticathode. Data were recorded in the interval  $2.0 - 70.0^\circ$

( $2\theta$ ), with a step of  $0.08^\circ$  and a counting time of  $1 \text{ s}/^\circ$ . Analyses at low theta angles  $1.0 - 10.0^\circ$  ( $2\theta$ ) were performed using small divergence slits ( $0.3^\circ$ ) with a step of  $0.01^\circ$  and a counting time of  $10 \text{ s}/^\circ$ .

The FTIR spectra were measured in transmission mode using a Nicolet 5700 spectrophotometer and the KBr pellet technique (1 weight % of sample diluted in KBr); spectra were recorded in the  $400\text{-}4000 \text{ cm}^{-1}$  range with a resolution of  $4 \text{ cm}^{-1}$ .

The TGA curves were obtained using a Setaram TGA 92 instrument under atmospheric air; a heating rate of  $5^\circ\text{C}/\text{min}$  was applied and weight losses were measured in the interval of  $25 - 1100^\circ\text{C}$ .

Solid state NMR experiments were performed with a 300 Bruker spectrometer at  $75.47 \text{ MHz}$ , using magic angle spinning (MAS) condition at  $10 \text{ kHz}$  and a  $4 \text{ mm}$  diameter size zirconia rotor.  $^{13}\text{C}$  ( $I = 1/2$ ) spectra obtained by proton enhanced cross-polarization method (CP) were referenced to the carbonyl of glycine calibrated at  $176.03 \text{ ppm}$ . Recycling and contact times were  $5 \text{ s}$ . and  $1 \text{ ms}$ ., respectively. To get a proper signal to noise ratio,  $10.000$  to  $15.000$  scans were needed.

#### 4.2.4 EQUILIBRIUM ISOTHERMS FOR CLAVULANIC ACID ADSORPTION

Studies of CA adsorption on LDH were determined using a closed reactor under magnetic stirring and immersed in a water bath to control the temperature. Adsorption isotherms were measured at different temperatures ( $20$ ,  $30$  and  $35^\circ\text{C}$ ) and for different LDH adsorbent compositions ( $\text{Zn}_2\text{Cr-NO}_3$ ,  $\text{Zn}_2\text{Al-NO}_3$  and  $\text{Mg}_2\text{Al-NO}_3$ ), which were obtained by the coprecipitation method described previously, with a solid to liquid ratio  $\varepsilon_{\text{st}}$  of  $1.0 \text{ mg/mL}$ .

The CA adsorption capacities of LDH were evaluated according to equation 4.1:

$$q^* = \frac{(C_0 - C^*) V}{m} \quad (4.1)$$

where  $q^*$  is the amount of CA adsorbed at equilibrium,  $C_0$  and  $C^*$  are the concentrations of CA in the liquid phase respectively at time  $t = 0$  and at equilibrium,  $V$  is the volume of the liquid phase and  $m$  is the adsorbent mass.

The competitive adsorption between CA and amino acids was measured at 30°C using  $Zn_2Cr-NO_3$  as adsorbent in presence of either tyrosine (0.1 g/L) or a mixture of tyrosine and lysine (both at a concentration of 0.1 g/L); such concentration of amino acids are commonly encountered in the fermentation of broths (Silva et al., 2012).

#### 4.2.5 CLAVULANIC ACID CONCENTRATION DETERMINATION

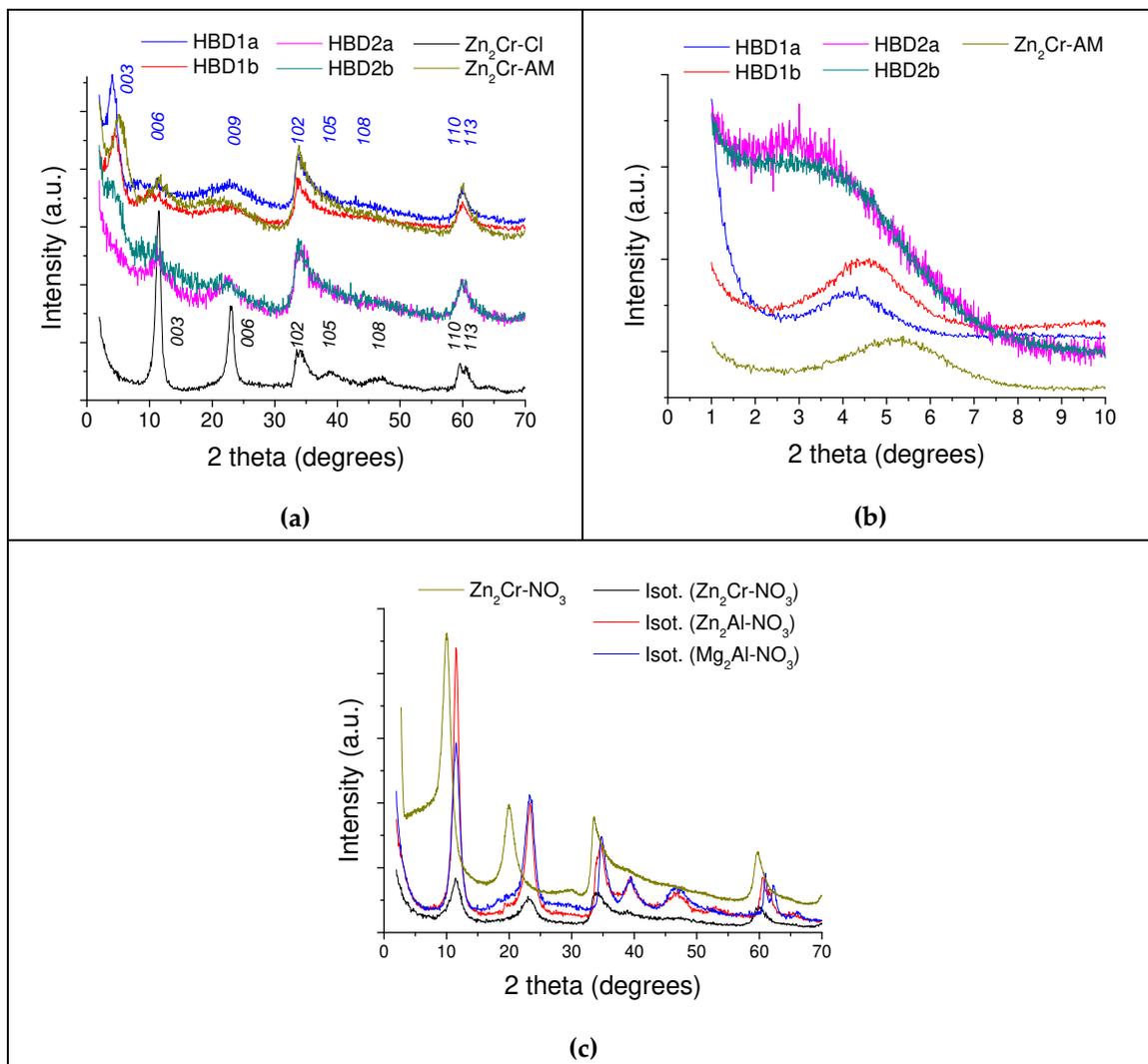
The CA concentrations were determined by spectrophotometric analysis of the product of the reaction of CA with imidazole (Bird et al., 1982). Spectrophotometric determination of this reaction product was performed using two different solutions: in solution A, 5 mL of imidazole (60 g/L, pH 6.8) was added to 1 mL of sample and the blank was the solution formed by mixing 5 mL of imidazole and 1 mL of distilled water; in solution B, 5 mL of distilled water was added to 1 mL of sample and the blank was distilled water. The solutions were heated to 30°C for 15 min. Then, the absorbance of solutions A and B were measured at  $\lambda = 312$  nm using a Nicolet (Evolution) 500 spectrophotometer. The difference of absorbance between both solutions (A and B) was used for calibration as a function of the concentration. This relationship for CA concentrations is linear

below 50 mg/L, therefore the samples were appropriately diluted to be in this range.

## 4.3 RESULTS AND DISCUSSION

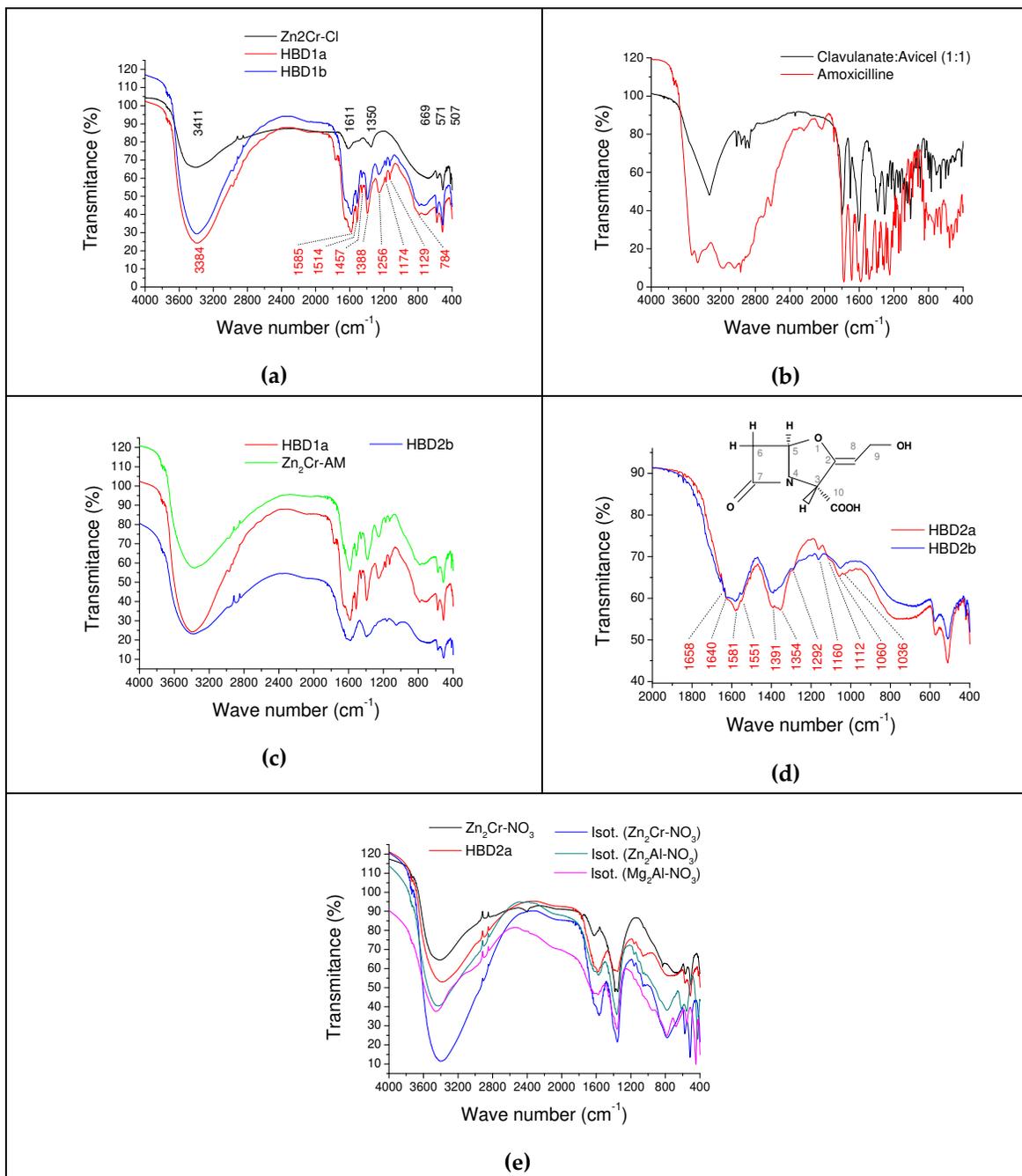
### 4.3.1 PREPARATION AND CHARACTERIZATION OF LDH ADSORBENTS AND Zn<sub>2</sub>Cr-CA HYBRID ASSEMBLIES

In Table 4.1 are summarized the synthesis conditions for Zn<sub>2</sub>Cr-Cl and for HBD1 and HBD2 hybrids; the values of the interlayer distances as determined from X-ray diffraction analysis are also given. The PXRD patterns displayed in Figure 4.2 are characteristic of LDH materials. As expected, Zn<sub>2</sub>Cr-Cl is more crystalline than CA containing phases, CA intercalation resulting in a strong structural disorder. The interlamellar distance is deduced from the position of the first 00l Bragg reflection at low 2 theta angles. The shift of this reflection to lower 2 theta angle for hybrid samples indicates an increase of the interlayer distance from 0.78 nm for Zn<sub>2</sub>Cr-Cl (Feng et al., 2006) to ca 2.08 nm for hybrid samples and is consistent with the intercalation of the cumbersome CA molecule in Zn<sub>2</sub>Cr-LDH host. After analysis of the results obtained with source 1, it was decided to continue performing syntheses at room temperature, due to operational convenience, since the results were significantly similar, even when varying temperature,  $d(003) = 2.08$  and  $2.00$  nm. With respect the excess, according Figures 4.2 and 4.3 for HBD2a and HBD2b, is also possible to verify the similarity between the results using both 5 and 10 over the amount of Cr<sup>3+</sup> cations,  $d(003) = 2.60$  and  $2.30$  nm.



**Figure 4.2:** (a) Powder XRD diffractograms of Zn<sub>2</sub>Cr-Cl LDH the Zn<sub>2</sub>Cr hybrid assemblies (HBD1, HBD2 and Zn<sub>2</sub>Cr-AM) performed; (b) low theta (1 – 10°) measurements; (c) Zn<sub>2</sub>Cr-NO<sub>3</sub> LDH and the adsorbents at the end of the adsorption experiments.

To further characterize CA adsorption and/or intercalation, FTIR analysis were carried out on all samples prepared and compared to free molecules (Figure 4.3). IR bands characteristic of LDH hydroxide host are observed with an intense band localized at 3411 cm<sup>-1</sup> resulting from the overlap of deformation and stretching vibrations for physically adsorbed and interlayer water molecules as well as structural OH groups.



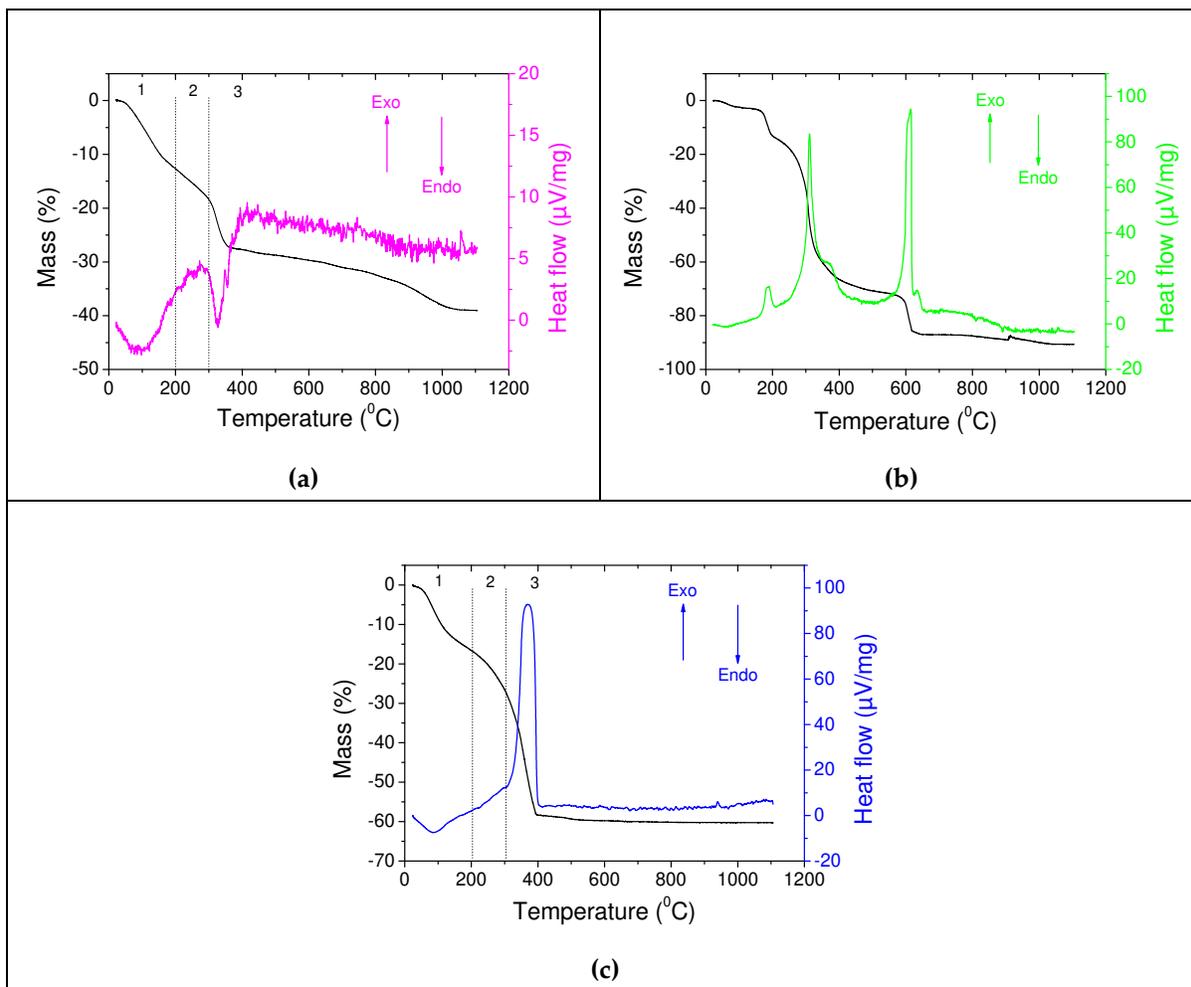
**Figure 4.3:** FTIR spectra of (a) Zn<sub>2</sub>Cr-Cl and HBD1 hybrids, (b) CA and AM molecules, (c) comparison among CA hybrids HBD1, HBD2 and Zn<sub>2</sub>Cr-AM, (d) gives a detailed indexation of IR bands for HBD2 hybrids in the range 400-2000 cm<sup>-1</sup>, (e) comparison among LDH adsorbent, CA hybrid and the adsorbents at the end of the adsorption experiments.

The band at  $1611\text{ cm}^{-1}$  is due to deformation vibrations of water molecules. The band at  $1350\text{ cm}^{-1}$  corresponds to  $\nu_3$  stretching of carbonate anions, a contamination difficult to avoid and that probably occurred during the drying step. The other bands at  $669$ ,  $571$  and  $507\text{ cm}^{-1}$  arise from metal-oxygen bonds within the hydroxide layers (M-O or O-M-O, where M = Zn, Cr) (Islam and Patel, 2010).

In Figure 4.3a, the presence of CA into HBD1 sample is confirmed by the presence of additional vibration bands between  $1700$  and  $800\text{ cm}^{-1}$ . However, the overlap between CA and amoxicillin (AM) IR bands makes it difficult the identification (Figure 4.3b). When comparing with the spectrum obtained for  $\text{Zn}_2\text{Cr-AM}$  (Figure 4.3c), it is likely that the molecule present in HBD1 hybrid assembly is AM rather than CA and not both. On the other hand, the presence of CA into the HBD2 hybrid material is highly probable as evidenced in Figure 4.3d by the presence of characteristic bands of CA i.e. the  $\text{C}^2=\text{C}^8$  double bond (vibrations bands in the region between  $840$  and  $720\text{ cm}^{-1}$ , also at  $1640$  and  $1657\text{ cm}^{-1}$ ), the  $\text{C}^2-\text{O}-\text{C}^5$  ether group and  $\text{C}^7-\text{N}$  bond with nitrogen (stretching bands in the region between  $1000$  and  $1300\text{ cm}^{-1}$ ), finally the  $\text{C}^{10}-\text{OOH}$  carboxylic group (vibration bands at  $1391\text{ cm}^{-1}$ , also at  $1551$  and  $1581\text{ cm}^{-1}$ ).

The thermo-gravimetric analysis (TGA) was carried out to determine the quantity of water molecule per formula unit as well as to quantify the amount of intercalated CA. At first, for pristine  $\text{Zn}_2\text{Cr-Cl}$  (Pisson et al., 2003), the thermal decomposition basically proceeds in three steps (Figure 4.4a): (1) at temperatures up to  $200^\circ\text{C}$ , the mass loss is attributed to the removal of water, interlayer and physisorbed water molecules; (2) around  $200^\circ\text{C}$ , the dehydroxylation of the hydroxide layers occurs, immediately followed by (3) the decomposition of

chloride anions, starting around 300°C; chloride anion decomposition is complete at ca 1100°C.



**Figure 4.4:** Thermo-gravimetric and heat flow curves for (a) Zn<sub>2</sub>Cr-Cl, (b) CA (Clavulanate:Avicel) and (c) HBD2b hybrid .

Regarding the Zn<sub>2</sub>Cr-Cl LDH (Figure 4.4a), from the different weight losses measured ( $\Delta m_{(1)} = 12.50\%$ ,  $\Delta m_{(2)} = 6.25\%$  and  $\Delta m_{(3)} = 20.00\%$ ), a total molecular mass of 367.4 g/mol is calculated in agreement with the following formula:  $Zn_2Cr(OH)_6Cl \cdot 2.62H_2O$ .

The thermal decomposition of CA occurs in four steps (Figure 4.4b). The weight loss observed at 200°C is due to strongly bonded water molecules (Islam and Patel, 2010). The decomposition of the CA molecule alone is likely to be associated with the mass loss obtained around 300°C, while the other thermal events may be due to the presence of cellulose. Indeed, cellulose is known to thermally decomposes above 350°C up to approximately 500°C (Jollet et al., 2009) involving first the glycosidic bonds located on the surface and at the end of linear chains. Therefore, decompositions observed here between 350 and 600°C may be related to the presence of cellulose. The exothermic peak observed in the region between 300 and 400°C for HBD2 (Figure 4.4c) is characteristic of CA decomposition as previously discussed, thus supporting CA intercalation. From the different weight losses measured ( $\Delta m_{(1)} = 17.0\%$ ,  $\Delta m_{(2)} = 10.0\%$  and  $\Delta m_{(3)} = 33.0\%$  caused respectively by the removal of interlayer water molecules, dehydroxylation and interlayer anion decomposition processes), a total molecular mass of 582.0 g/mol is calculated leading to a molecular mass for the intercalated anion of 194.0 g/mol which is very close to that expected for CA i.e. 199.2 g/mol; the resulting chemical formula is the following:  $Zn_2Cr(OH)_6(CA = C_8H_9NO_5) \cdot 5.45H_2O$ .

To get further insights into the interactions between host  $Zn_2Cr$ -LDH host structure and intercalated organic anions i.e. CA or AM, also the identity of the intercalated anion,  $Zn_2Cr$ -CA hybrids were analyzed by  $^{13}C$  CPMAS spectroscopy (Figure 4.5). The assignments were carried out using the labeling of the molecule (inset of Figure 4.5) according to the literature (Elson et al., 1982). Clearly, the chemical shifts observed in the NMR spectra for Clavulanate:Avicel and Clavulin® agree well with the expected molecular composition. However, additional resonance lines are observed and attributed to chemical additives. When

scrutinized on the enlarged part, it is clear that the additives are different with probably some carboxylic acid based molecules with aromatic cycle (chemical shift around 120 ppm) and methylene carbon (30 ppm) to C-O-C chemical function (75 ppm) for Clavulin. The latter contribution is also depicted for Clavulanate:Avicel and may be attributed to cellulose. When CA is incorporated in between Zn<sub>2</sub>Cr-LDH layers, the resonance lines are broadened, thus suggesting a decrease in the relaxation time, probably as a consequence of the lamellar sequestration and the partial loss of molecular motion (Figure 4.6).

A high-field shift of C<sup>-10</sup> is observed that may be indicative of electrostatic interaction between the carboxylate function and OH groups from LDH hydroxyl layers. C<sup>-9</sup> which is bearing hydroxyl function is apparently shifted to lower field and this may be due to intermolecular interaction between adjacent CA molecules within Zn<sub>2</sub>Cr-LDH interlayer space. Surprisingly, C<sup>-6</sup> inside the oxazolidine ring carbon skeleton is not visible on <sup>13</sup>C CPMAS spectrum of Zn<sub>2</sub>Cr-CA hybrids. It is interesting to note that the chemical shift present at 100 ppm is absent suggesting that the associated carbonaceous molecule is somehow excluded from LDH interlayer space and demonstrating a role of molecular sieves of LDH toward potential guest. However, the presence of the resonance lines centered at 75 ppm proves that the cellulose cannot be completely separated from CA and this is probably due to either the associated long polymer chain of cellulose or/and an unavoidable interaction of its strongly polar backbone with LDH platelets.

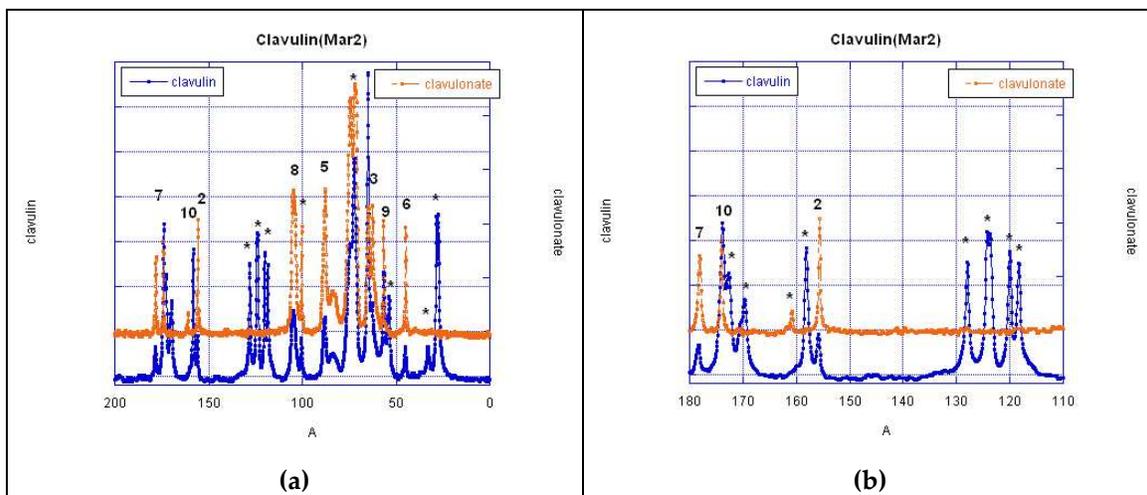


Figure 4.5:  $^{13}\text{C}$  CPMAS NMR measurements for Clavulin<sup>®</sup> and Clavulanate:Avicel (1:1).

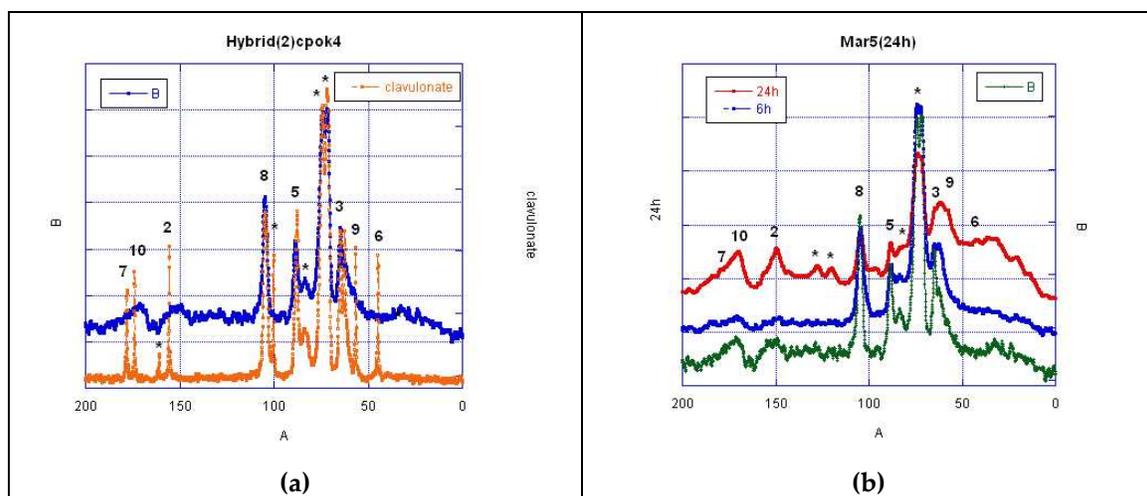


Figure 4.6:  $^{13}\text{C}$  CPMAS NMR measurements for Clavulanate:Avicel (1:1) and the corresponding  $\text{Zn}_2\text{Cr}$ - hybrid assemblies (HBD2a and HBD2b).

Additional contributions are observed around 120 ppm, as well as at higher field values that can be attributed to some degradation of CA molecule when standing long time at basic pH resulting in the breakdown of the fused bicyclic backbone of CA molecule.

### 4.3.2 CLAVULANIC ACID ADSORPTION ON LAYERED DOUBLE HYDROXIDES

The adsorption equilibrium of CA in different LDH-type phases,  $M_2Al-NO_3$  with  $M = Zn, Mg$  and  $Zn_2Cr-NO_3$ , was studied at 20, 30 and 35°C to estimate their potentialities for ion exchange as well as the possible competitive effects in presence of amino acids (tyrosine and tyrosine + lysine complex) (Figure 4.7). The presence of the CA molecule in the adsorbents structures at the end of the adsorption experiments is evidenced in Figure 4.3e by the presence of characteristic bands of CA, but this adsorption is probably localized on the superficies of the materials since differences in the interlamellar distances are not evident (Figure 4.2c).

As previously observed for calcined hydrotalcite (Forte et al., 2012), CA adsorption is found here to be an endothermic process, with an adsorption capacity of larger amplitude when increasing the temperature and ranking as follows:  $Zn_2Cr-NO_3 \approx Zn_2Al-NO_3 > Mg_2Al-NO_3$ . Since  $Zn_2Cr-LDH$  phase is able to form around neutral pH, this phase was selected for a detailed analysis of CA adsorption and it is found that the presence of amino acid contaminants did not affect the adsorption capacity of  $Zn_2Cr-NO_3$  toward the molecule CA (Figure 4.7a).

Among the models used to fit to equilibrium adsorption isotherms (experimental data), Freundlich model ( $q^* = k_F (C^*)^{n_F}$ ) is the most relevant for  $Zn_2Cr-NO_3$  adsorbent (Figure 4.8 and Table 4.2), which assumes a heterogeneous surface associated with a non-uniform distribution of the heat of adsorption (Gunay et al., 2007). For comparison, the same graph shows the data of CA adsorption in a  $Mg_4Al-CO_3$  adsorbent (Forte et al., 2012), where it can be seen that in the present study the adsorption coefficient is considerably larger.

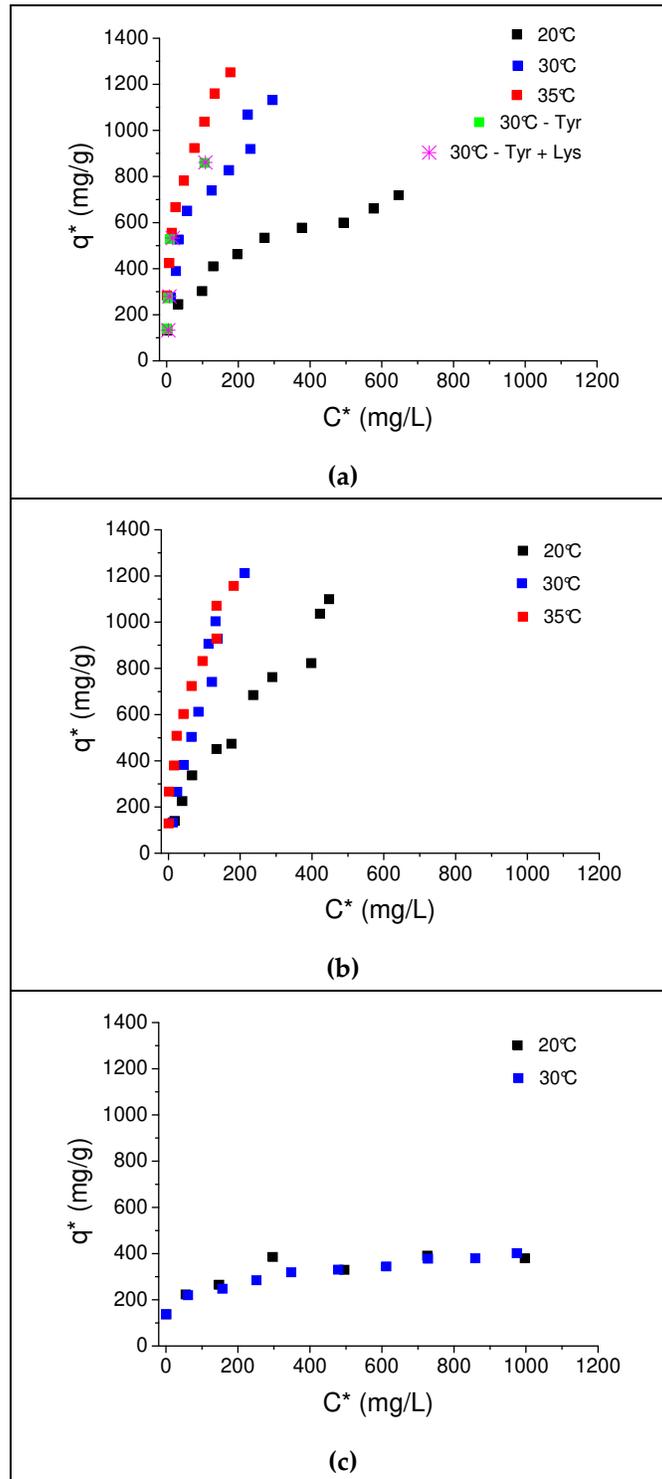
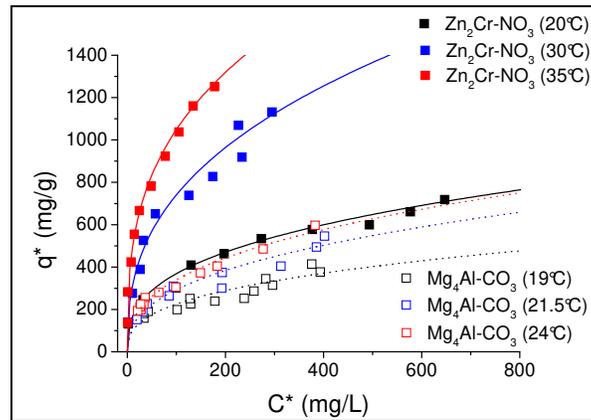


Figure 4.7: Adsorption isotherms of CA on (a) Zn<sub>2</sub>Cr-NO<sub>3</sub>, (b) Zn<sub>2</sub>Al-NO<sub>3</sub> and (c) Mg<sub>2</sub>Al-NO<sub>3</sub>.



**Figure 4.8:** Non-linear regression (Freundlich model) of the experimental data for the CA adsorption isotherms on  $Zn_2Cr-NO_3$  and  $Mg_4Al-CO_3$  (Forte et al., 2012) at different temperatures.

**Table 4.2:** Equilibrium and thermodynamic parameters of CA adsorption on  $Zn_2Cr-NO_3$  LDH.

T (°C)	Equilibrium			Thermodynamic			
	$k_F$ ( $mg^{1-n_F} L^{n_F} g^{-1}$ )	$n_F$	$R^2$	$k_c$	$\Delta G^\circ$ (kJ/mol)	$\Delta H^\circ$ (kJ/mol)	$\Delta S^\circ$ (kJ/mol.K)
20	73.63	0.35	0.977	3.893	-3.271	20.516	0.081
30	128.76	0.38	0.966	4.776	-4.082		
35	229.62	0.33	0.992	5.981	-4.488		

Furthermore, an increase in temperature causes a pronounced variation on this parameter, indicating even larger adsorption, since the parameter  $n_F$  remains nearly constant as function of temperature; thus underlining the role of the platelets charge density  $Zn_2Cr-NO_3 > Mg_4Al-CO_3$ .

Thermodynamically the dependence of adsorption as a function of temperature results in parameters such as the Gibbs free energy, enthalpy and entropy (Barboza et al., 2003). The Gibbs free energy ( $\Delta G^\circ$ ) may be calculated according to (Gunay et al., 2007):

$$\Delta G^0 = -RT \ln k_c \quad (4.2)$$

where R is the universal gas constant ( $8.315 \times 10^{-3}$  kJ/mol.K), T the temperature in Kelvin and  $k_c$  is the thermodynamic equilibrium constant which corresponds to the intersection, extrapolating  $q^*$  to zero, for the straight line of  $\ln (q^*/C^*)$  versus  $q^*$  (Gunay et al., 2007). Standard enthalpies ( $\Delta H^\circ$ ) and entropies ( $\Delta S^\circ$ ) of the process may be associated by:

$$\Delta G^0 = \Delta H^0 - T\Delta S^0 \quad (4.3)$$

The thermodynamic study is an important tool for process investigation regarding the spontaneity and the degree of freedom of the adsorbed molecule. A spontaneous adsorption process occurs when  $\Delta G^\circ$  is negative and positive values of  $\Delta S^\circ$  correspond to an increase in the degree of freedom of the adsorbed molecules (Khraisheh et al., 2002; Forte et al., 2012). The relationship between equations 4.2 and 4.3 generates a linear fit of  $\ln k_c$  versus  $1/T$  ( $R^2 = 0.948$ ) which allows for determining the thermodynamic parameters (Table 4.2). The negative value of the Gibbs free energy suggests a spontaneous process at the three temperatures tested here. The CA adsorption in the  $Zn_2Cr$ -LDH was spontaneous at all temperatures. Previous studies found that the CA adsorption in hydrotalcites was not spontaneous at temperatures below  $24^\circ C$  (Forte et al., 2012). The positive value of  $\Delta H^\circ$  confirms the endothermic nature of CA adsorption process.

The diffusion process of organic molecules in porous adsorbents can be endothermic or exothermic driven (Khraisheh et al., 2002), and an increased

adsorption capacity to an enhancement in mobility. It may be interpreted for the molecules to diffuse within the porous structure of the adsorbent by overcoming the energy activation barrier and increasing the intra-particle diffusion rate (Asouhidou et al., 2009). The diffusion process of organic molecules in porous adsorbents can be endothermic or exothermic (Khraisheh et al., 2002). Some authors have attributed the increased adsorption capacity to the increase in mobility and penetration of the molecules within the porous structure of the adsorbent, overcoming the energy activation limit and increasing the intra-particle diffusion rate (Asouhidou et al., 2009). The positive value of  $\Delta S^\circ$  corresponds to an increase in the degree of freedom of the CA molecule. Another possible process for the positive  $\Delta H^\circ$  and  $\Delta S^\circ$  values is a two-step mechanism consisting in an exchange of formerly adsorbed solvent molecules (water) followed by an adsorption of CA molecules (Khraisheh et al., 2002). Again  $Zn_2Cr-NO_3$  LDH compares well  $Mg_4Al-CO_3$  since CA adsorption requires less heat ( $\Delta H^\circ = 94.602$  kJ/mol and  $\Delta S^\circ = 0.319$  kJ/mol.K for  $Mg_4Al-CO_3$ ) (Forte et al., 2012) as well as with other anion exchange resins such as IRA 400 CA adsorbent characterized by an exothermic process ( $\Delta H^\circ = -29.150$  kJ/mol and  $\Delta S^\circ = 0.076$  kJ/mol K) (Barboza et al., 2003).

#### 4.4 CONCLUSIONS

LDH-type framework were synthesized, characterized, and evaluated for CA intercalation and adsorption. A strong affinity of LDH clay toward the molecule CA is evidenced by its intercalation through soft chemistry route using coprecipitation method. CA intercalation into LDH, either  $Zn_2Cr-NO_3$ ,  $Zn_2Al-NO_3$  or  $Mg_2Al-NO_3$ , leads to a significant increase of the interlayer. In parallel, a pronounced adsorption described by Freundlich model and temperature-favoured

is observed. Additionally, CA adsorption is found to be an endothermic and spontaneous process.  $Zn_2Cr-NO_3$  is the most efficient adsorbent, and the adsorption capacity of the molecule is not influenced by the presence of amino acids, thus underlining that such LDH composition may be a suitable alternative for the separation of the biomolecule CA.

#### 4.5 ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are grateful for the financial support from CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior)/MEC/Brazil, Grant n° 6843/10-7 and FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo), Grant n° 2008/57298-3.

#### 4.6 REFERENCES

- ASOUHIDOU, D. D.; TRIANTAFYLLIDIS, K. S.; LAZARIDIS, N. K.; MATIS, K. A.; KIM, S. S.; PINNAVAIA, T. J. Sorption of reactive dyes from aqueous solutions by ordered hexagonal and disordered mesoporous carbons. **Micropor Mesopor Mat**, v. 117, p. 257-267, 2009.
- 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. **Biochem Eng J**, v. 14, p. 19-26, 2003.
- BERSANETTI, P. A.; ALMEIDA, R. M. R. G.; BARBOZA, M.; ARAUJO, M. L. G.; HOKKA, C. O. Kinetic studies on clavulanic acid degradation. **Biochem Eng J**, v. 23, p. 31-36, 2005.
- BIRD, A. E.; BELLIS, J. M.; GASSON, B. C. Spectrophotometric Assay of Clavulanic Acid by Reaction with Imidazole. **Analyst**, v. 107, p. 1241-1245, 1982.
- BONINA, F. P.; GIANNOSSI, M. L.; MEDICI, L.; PUGLIA, C.; SUMMA, V.; TATEO, F. Diclofenac-hydrotalcite: In vitro and in vivo release experiments. **Appl. Clay Sci.**, v. 41, p. 165-171, 2008.

- CHOY, J.-H.; KWAK, S.-Y.; PARK, J.-S.; JEONG, Y.-J.; PORTIER, J. Intercalative Nanohybrids of Nucleoside Monophosphates and DNA in Layered Metal Hydroxide. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 121, p. 1399-1400, 1999.
- DUPIN, J.-C.; MARTINEZ, H.; GUIMON, C.; DUMITRIU, E.; FECHETE, I. Intercalation compounds of Mg–Al layered double hydroxides with dichlophenac: different methods of preparation and physico-chemical characterization. **Appl. Clay Sci.**, v. 27, p. 95-106, 2004.
- ELSON, S. W.; OLIVER, R. S.; BYCROFT, B. W.; FARUK, E. A. Studies on the Biosynthesis of Clavulanic Acid .3. Incorporation of DL-[3,4-(C2)-C-13]Glutamic Acid. **J Antibiot**, v. 35, p. 81-86, 1982.
- FENG, Y. J.; WILLIAMS, G. R.; LEROUX, F.; TAVIOT-GUÉHO, C.; O'HARE, D. Selective Anion-Exchange Properties of Second-Stage Layered Double Hydroxide Heterostructures. **Chem. Mater.**, v. 18, p. 4312-4318, 2006.
- FORANO, C.; HIBINO, T.; LEROUX, F.; TAVIOT-GUÉHO, C. Layered Double Hydroxides. In: BERGAYA, F.; THENG, B. K. G.; LAGALY, G. **Handbook of Clay Science**, Amsterdam: Elsevier, 2006, p. 1021-1095.
- FORTE, M. B. S.; ELIAS, E. C. L.; PASTORE, H. O.; MAUGERI, F.; RODRIGUES, M. I. Evaluation of Clavulanic Acid Adsorption in MgAl-layered Double Hydroxides: Kinetic, Equilibrium and Thermodynamic Studies. **Adsorpt Sci Technol**, v. 30, p. 65-80, 2012.
- GUNAY, A.; ARSLANKAYA, E.; TOSUN, I. Lead removal from aqueous solution by natural and pretreated clinoptilolite: Adsorption equilibrium and kinetics. **Journal of Hazardous Materials**, v. 146, p. 362-371, 2007.
- HIBINO, T. Delamination of Layered Double Hydroxides Containing Amino Acids. **Chem. Mater.**, v. 16, p. 5482-5488, 2004.
- HOWARTH, T. T.; BROWN, A. G.; KING, T. J. Clavulanic Acid, a Novel Beta-Lactam Isolated from *Streptomyces-Clavuligerus* - X-Ray Crystal-Structure Analysis. **J Chem Soc Chem Comm**, v. p. 266-267, 1976.
- INACIO, J.; TAVIOT-GUÉHO, C.; FORANO, C.; BESSE, J.-P. Adsorption of MCPA pesticide by MgAl-layered double hydroxides. **Appl. Clay Sci.**, v. 18, p. 255-264, 2001.
- ISLAM, M. and PATEL, R. Synthesis and physicochemical characterization of Zn/Al chloride layered double hydroxide and evaluation of its nitrate removal efficiency. **Desalination**, v. 256, p. 120-128, 2010.

- JOLLET, V.; CHAMBON, F.; RATABOUL, F.; CABIAC, A.; PINEL, C.; GUILLON, E.; ESSAYEM, N. Non-catalyzed and Pt/ $\gamma$ -Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-catalyzed hydrothermal cellulose dissolution–conversion: influence of the reaction parameters and analysis of the unreacted cellulose. **Green Chem.**, v. 11, p. 2052–2060, 2009.
- KHRAISHEH, M. A. M.; AL-DEGS, Y. S.; ALLEN, S. J.; AHMADA, M. N. Elucidation of controlling steps of reactive dye adsorption on activated carbon. **Ind. Eng. Chem. Res.**, v. 41, p. 1652-1657, 2002.
- KIM, I. C.; KIM, C. H.; HONG, S. I.; KIM, S. W. Fed-batch cultivation for the production of clavulanic acid by an immobilized *Streptomyces clavuligerus* mutant. **World J Microb Biot**, v. 17, p. 869-872, 2001.
- LEROUX, F.; GACHON, J.; BESSE, J.-P. Biopolymer immobilization during the crystalline growth of layered double hydroxide. **J. Solid State Chem.**, v. 177, p. 245-250, 2004.
- LV, L.; HE, J.; WEI, M.; DUAN, X. Kinetic Studies on Fluoride Removal by Calcined Layered Double Hydroxides. **Ind. Eng. Chem. Res.**, v. 45, p. 8623-8628, 2006.
- MAITI, S. N.; PHILLIPS, O. A.; MICETICH, R. G.; LIVERMORE, D. M. beta-lactamase inhibitors: Agents to overcome bacterial resistance. **Curr Med Chem**, v. 5, p. 441-456, 1998.
- MARANGONI, R.; BOUHENT, M.; TAVIOT-GUÉHO, C.; WYPYCH, F.; LEROUX, F. Zn<sub>2</sub>Al layered double hydroxides intercalated and adsorbed with anionic blue dyes: A physico-chemical characterization. **J. Colloid Interface Sci.**, v. 333, p. 120-127, 2009.
- MAYER, A. F.; ANSPACH, F. B.; DECKWER, W. D. Purification of clavulanic acid by ion-pairing systems. **Bioseparation**, v. 6, p. 25-39, 1996.
- NEWMAN, A. C. D. **Chemistry of Clays and Clay Minerals**. New York: Wiley-Interscience, 1987.
- PISSON, J.; TAVIOT-GUEHO, C.; ISRAELI, Y.; LEROUX, F.; MUNSCH, P.; ITIE, J. P.; BRIOIS, V.; MOREL-DESROSIERS, N.; BESSE, J. P. Staging of organic and inorganic anions in layered double hydroxides. **J Phys Chem B**, v. 107, p. 9243-9248, 2003.
- READING, C. and COLE, M. Clavulanic Acid - Beta-Lactamase-Inhibiting Beta-Lactam from *Streptomyces-Clavuligerus*. **Antimicrob Agents Ch**, v. 11, p. 852-857, 1977.

- SAUDAGAR, P. S.; SURVASE, S. A.; SINGHAL, R. S. Clavulanic acid: A review. **Biotechnol Adv**, v. 26, p. 335-351, 2008.
- SILVA, C. S.; CUEL, M. F.; BARRETO, V. O.; KWONG, W. H.; HOKKA, C. O.; BARBOZA, M. Separation of clavulanic acid from fermented broth of amino acids by an aqueous two-phase system and ion-exchange adsorption. **New Biotechnol**, v. 29, p. 428-431, 2012.
- SUN, Y.; ZHOU, Y.; YE, X.; CHEN, J.; WANG, Z. Fabrication and infrared emissivity study of hybrid materials based on immobilization of collagen onto exfoliated LDH. **Mater. Lett.**, v. 62, p. 2943-2946, 2008.
- TANG, P.; XU, X.; LIN, Y.; LI, D. Enhancement of the Thermo- and Photostability of an Anionic Dye by Intercalation in a Zinc-Aluminum Layered Double Hydroxide Host. **Ind. Eng. Chem. Res.**, v. 47, p. 2478-2483, 2008.
- TAVIOT-GUÉHO, C.; HALMA, M.; CHARRADI, K.; FORANO, C.; MOUSTY, C. Structural and electrochemical characterization of metallo-porphyrins intercalated into ZnCr-layered double hydroxides: some evidence of dimer formation. **New J. Chem.**, v. 35, p. 1898-1905, 2011.
- TROUTIER-THUILLIEZ, A.-L.; TAVIOT-GUÉHO, C.; CELLIER, J.; HINTZEBRUENING, H.; LEROUX, F. Layered particle-based polymer composites for coatings: Part I. Evaluation of layered double hydroxides. **Prog. Org. Coat.**, v. 64, p. 182-192, 2009.
- YANG, L.; SHAHRIVARI, Z.; LIU, P. K. T.; SAHIMI, M.; TSOTSIS, T. T. Removal of Trace Levels of Arsenic and Selenium from Aqueous Solutions by Calcined and Uncalcined Layered Double Hydroxides (LDH). **Ind. Eng. Chem. Res.**, v. 44, p. 6804-6815, 2005.

## CAPÍTULO 5

**Desenvolvimento e caracterização de micropartículas de alginato com hidróxidos duplos lamelares encapsulados e sua aplicação como adsorventes em coluna de leito fixo para separação de ácido clavulânico**

*Artigo em preparação para submissão.*



**Desenvolvimento e caracterização de micropartículas de alginato com hidróxidos duplos lamelares encapsulados e sua aplicação como adsorventes em coluna de leito fixo para separação de ácido clavulânico**

**Marcus Bruno Soares Forte<sup>1\*</sup>, Christine Taviot-Guého<sup>2</sup>, Fabrice Leroux<sup>2</sup>,  
Maria Isabel Rodrigues<sup>1</sup> e Francisco Maugeri Filho<sup>1</sup>**

*(1) Laboratório de Engenharia de Bioprocessos, Departamento de Engenharia de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), R. Monteiro Lobato, 80, Campinas-SP, 13083-862, Brasil.*

*(2) Clermont Université, Université Blaise Pascal, Institut de Chimie de Clermont-Ferrand, BP 10448, F-63000 CLERMONT-FERRAND; CNRS, UMR 6296, ICCF, F-63171 AUBIERE.*

**RESUMO**

Esse trabalho teve como foco o desenvolvimento de um sistema alternativo para separação por adsorção de ácido clavulânico (CA). Os adsorventes testados foram da classe dos hidróxidos duplos lamelares (LDH). As fases  $Zn_2Cr-NO_3$  foram sintetizadas pelo método de coprecipitação a pH constante e posteriormente

caracterizadas por difração de raios-X (PXRD) e espectroscopia na região do infravermelho (FTIR). Partículas contendo cristais de  $Zn_2Cr-NO_3$  encapsulados em microgéis de alginato ( $LDH_{ME}$ ) foram obtidas através de gelificação iônica, a fim de possibilitar o uso desses adsorventes em colunas cromatográficas. As microesferas foram caracterizadas quanto à morfologia, densidade, diâmetro médio e porosidade. Uma coluna foi empacotada com as partículas de  $LDH_{ME}$  a fim de avaliar a separação de CA em relação aos aminoácidos tirosina (TYR) e prolina (PRO) pelo método de pulso cromatográfico. O difratograma PXRD dos LDH apresentou uma distância interlamelar  $d_{003} = 0,98$  nm e uma forte banda a  $1384$   $cm^{-1}$  no perfil FTIR confirmaram a presença do ânion nitrato no espaço interlamelar. A caracterização das partículas de  $LDH_{ME}$  e do leito empacotado forneceram as seguintes propriedades: diâmetro médio das partículas,  $d_p = 171,4$   $\mu m$ ; densidade aparente,  $\rho_{bulk} = 0,63$   $g/cm^3$ ; densidade real,  $\rho_p = 2,17$   $g/cm^3$ ; porosidade da partícula,  $\epsilon_p = 0,71$   $g/cm^3$ ; porosidade do leito,  $\epsilon_B = 0,40$   $g/cm^3$ . O uso das partículas de  $LDH_{ME}$  na separação de CA a partir de misturas complexas contendo os aminoácidos (principais contaminantes oriundos do meio fermentativo) foi considerado satisfatório: cerca de 80 % dos aminoácidos saíram na exaustão inicial da coluna e a maior parcela de CA injetada (30 %) foi recuperada no estágio de eluição, levando os fatores de purificação a valores de 2,32 e a um grau de pureza das soluções de 93 %.

**Palavras-chave:** ácido clavulânico; hidróxidos duplos lamelares; microencapsulação; cromatografia; adsorção; leito fixo.

## 5.1 INTRODUÇÃO

Os processos de biosseparação podem ser idealizados em quatro grandes grupos: remoção de moléculas insolúveis, isolamento do produto, purificação e polimento (Belter et al., 1988). O conjunto dessas etapas merece atenção especial no processo produtivo de biomoléculas com alto valor agregado, já que pode ser responsável por até 90 % do custo total (Moraes et al., 2009). É grande o número de materiais que podem ser utilizados como adsorventes em bioprocessos, dependendo do tipo de moléculas a serem adsorvidas e suas respectivas características quanto à carga iônica, tamanho molecular, polaridade, hidrofobicidade entre outros (Luz et al., 2008; Moraes et al., 2009; Kuhn and Maugeri, 2010; Forte et al., 2011; Forte et al., 2012; Silva et al., 2012).

Hidróxidos duplos lamelares (LDH) são óxidos e hidróxidos minerais da classe dos não-silicatos (Newman, 1987; Forano et al., 2006), compostos por camadas do tipo brucita de hidróxidos metálicos carregadas positivamente. O domínio interlamelar de LDH se constitui essencialmente de moléculas de água e ânions, sendo grande o número de espécies aniônicas tanto orgânicas, incluindo algumas biomoléculas, como inorgânicas capazes de ocupar este domínio por intercalação ou adsorção (Leroux et al., 2004; Yang et al., 2006; Goh et al., 2008; Tang et al., 2008; Marangoni et al., 2009; Taviot-Guého et al., 2011). Esse material também é conhecido como “argilas aniônicas” devido a seu potencial de troca aniônica. Apresentam algumas propriedades físicas e químicas comparadas às de argilas minerais como estrutura lamelar (empilhamento de camadas), ampla composição química (devido à substituição de cátions metálicos), variação da densidade de cargas nas camadas, propriedades de troca iônica, nanoespaços

interlamelares reacionais, intumescência em água, propriedades reológicas e coloidais (Forano et al., 2006). No entanto, o alto grau de intumescimento torna-se uma barreira para o uso desses materiais como recheio de colunas cromatográficas, devido à compactação e conseqüentemente obstrução do leito. Assim, o desenvolvimento de tecnologias que propiciem o aproveitamento desses sólidos, tornando viável seu uso em processos de adsorção, especialmente em biosseparações, é uma oportunidade a ser explorada.

A formação de micropartículas por gelificação iônica de biopolímeros (tais como alginato, pectina ou carragena) é uma técnica que vem se destacando em diversos campos de aplicação, com a microencapsulação de diferentes espécies tais como antioxidantes naturais, ácidos graxos essenciais, enzimas, probióticos, aminoácidos, entre outros (Annan et al., 2008; Zimet and Livney, 2009; Perrechil et al., 2011; Souza et al., 2012). Logo, a utilização da técnica de microencapsulação aliada ao potencial dos LDH como adsorventes, através da utilização dos microgéis como suporte para os cristais de LDH, representa uma ferramenta interessante para a utilização desses materiais em colunas de biosseparação cromatográfica.

O ácido clavulânico (CA) (Figura 5.1) é um potente inibidor das  $\beta$ -lactamases e é considerado o principal composto produzido pela bactéria *Streptomyces clavuligerus* (Saudagar et al., 2008). Essa biomolécula atua como potencializador dos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos através da inibição competitiva das  $\beta$ -lactamases (Barboza et al., 2003).

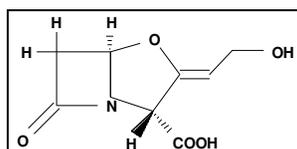


Figura 5.1: Estrutura química do ácido clavulânico.

A etapa de purificação apresenta rendimentos relativamente baixos devido a ausência de grupos fortemente hidrofóbicos (Mayer et al., 1996) e à alta instabilidade da molécula em função principalmente da temperatura e pH (Bersanetti et al., 2005; Santos et al., 2009; Forte et al., 2012). Em relação ao uso de processos de adsorção em fases intermediárias de purificação, alguns autores têm utilizado resinas químicas de troca aniônica (Barboza et al., 2003; Cuel et al., 2011; Silva et al., 2012). Porém, o preço dessas resinas é relativamente alto tornando o processo cada vez mais caro. Logo, é importante estudar e avaliar o potencial de adsorção de CA em adsorventes alternativos.

Nesse trabalho, foi desenvolvido microesferas de alginato com as partículas de LDH encapsuladas (LDH<sub>ME</sub>). Após caracterização, a aplicação das micropartículas LDH<sub>ME</sub> como recheio de colunas cromatográficas de leito fixo foi avaliada com relação à separação de CA a partir de soluções mistas contendo os aminoácidos tirosina e prolina.

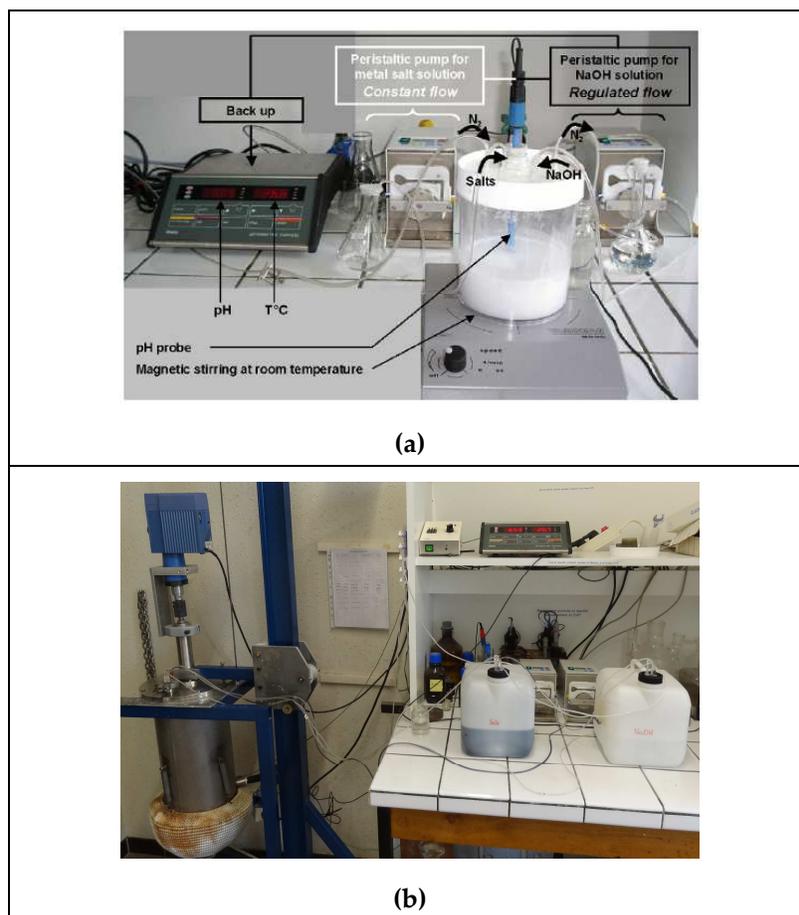
## 5.2 METODOLOGIA

### 5.2.1 MATERIAIS

Zn(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O, Cr(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>.9H<sub>2</sub>O, NaOH (Acros), Alginato de sódio (Vetec), Blue dextran (Sigma-Aldrich), Clavulin® (GlaxoSmithKline, United Kingdom), Clavulanate:Avicel (1:1) (Molekula Limited – Biomolekula, United Kingdom), Imidazol (USB), L-Tirosina e L-Prolina (Synth), Ninhidrina (Dinamica). Todos os outros reagentes usados foram com grau analítico.

## 5.2.2 SÍNTESE DE HIDRÓXIDOS DUPLOS LAMELARES

A síntese e caracterização dos adsorventes foram realizadas no Laboratório de Materiais Inorgânicos (Université Blaise Pascal, Clermont-Ferrand, France). As fases de LDH foram sintetizadas conforme o método de coprecipitação a pH constante pela adição dos sais no reator contendo água descarbonatada a temperatura ambiente, conforme o esquema apresentado na Figura 5.2a. O aparato experimental em escala piloto usado neste estudo está ilustrado na Figura 5.2b.



**Figura 5.2:** Montagem experimental para síntese de hidróxidos duplos lamelares (LDH) pelo método de coprecipitação: (a) pequena escala. Fonte: (Troutier-Thuilliez et al., 2009); (b) escala piloto.

A escolha do sistema LDH baseou-se em resultados anteriores (Forte et al., 2013b). Para obtenção das fases  $Zn_2Cr-NO_3$ , foram usadas soluções mistas de  $Zn(NO_3)_2$  e  $Cr(NO_3)_3$  resultando numa solução com concentração final de 0,1 M, com pH controlado em 6,5 através da adição de NaOH (0,2 M) e atmosfera inerte (isenta de  $CO_2$ , controlada com fluxo contínuo de nitrogênio). Após aproximadamente 24 h, a suspensão foi então centrifugada e lavada três vezes com água descarbonatada, sendo os pós secos em estufa a  $30^\circ C$  e posteriormente analisados por difração de raios-X no pó (PXRD) e espectroscopia na região do infravermelho por transformada de Fourier (FTIR).

### 5.2.3 CARACTERIZAÇÃO DOS HIDRÓXIDOS DUPLOS LAMELARES

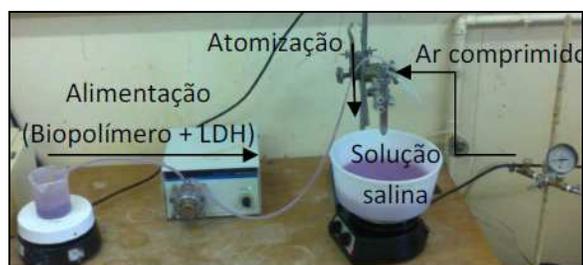
Os difratogramas PXRD foram obtidos em um difratômetro Siemens D501 usando radiação  $CuK\alpha$  no intervalo  $2,0 - 70,0^\circ (2\theta)$ , um passo de  $0,08^\circ$  e temperatura ambiente.

Os espectros FTIR foram avaliados pelo método de diluição em brometo de potássio: foram preparados *pellets* contendo 1 % de amostra e 99 % de KBr, as leituras foram realizadas com resolução de  $4\text{ cm}^{-1}$ , intervalo de varredura de 400 – 4000  $cm^{-1}$  e temperatura ambiente, usando um espectrofotômetro Nicolet 5700.

### 5.2.4 MICROENCAPSULAÇÃO

A produção das micropartículas LDH<sub>ME</sub> foi feita no Laboratório de Microestruturas de Alimentos (DEPAN/FEA/UNICAMP). As microcápsulas foram obtidas por gelificação do biopolímero alginato de sódio (ALG) 2 % (p/p) em presença de  $CaCl_2$  2 % (p/p) e pH 4,0 a temperatura ambiente. A solução do biopolímero, mantida sob agitação com um agitador magnético, foi bombeada

através de uma bomba peristáltica até a região de atomização, conforme Figura 5.3. Um bico aspersor com 1,0 mm de diâmetro conectado a um compressor, mantendo a pressão e velocidade de atomização constantes em 0,125 kgf/cm<sup>2</sup> e 555 mL/h, respectivamente, a uma distância de 12 cm da superfície da solução salina, também mantida sob agitação constante com um agitador magnético, foi o agente atomizador (Souza et al., 2012). Os microgéis foram mantidos em agitação na solução salina por 30 min para estabilização estrutural, lavadas duas vezes com água deionizada (pH 4,0), filtradas através de peneiras com abertura de 125 µm e guardadas a 8°C.



**Figura 5.3:** Preparo das microcápsulas LDH<sub>ME</sub>: aparato experimental da microencapsulação dos adsorventes em alginato por gelificação iônica.

As micropartículas contendo os LDH encapsulados (LDH<sub>ME</sub>) foram obtidas segundo a mesma metodologia, porém com a solução biopolimérica misturada, na razão de 15 % (p/v), e homogeneizada a 14000 rpm por 3 min usando um Turrax (IKA, Brazil). Anteriormente, os LDH haviam sido devidamente triturados em um moinho de martelos (Tecnal TE-631) e fracionados na granulometria entre 53 e 106 µm em um agitador magnético de peneiras (Bertel).

### 5.2.5 PROPRIEDADES DAS MICROCÁPSULAS

As micropartículas LDH<sub>ME</sub> foram caracterizadas quanto à morfologia, densidade ( $\rho_p$ , g/cm<sup>3</sup>), diâmetro médio das partículas ( $d_p$ ,  $\mu\text{m}$ ), diâmetro médio de poros ( $d_{\text{pore}}$ , nm), densidade aparente ( $\rho_{\text{bulk}}$ , g/cm<sup>3</sup>) e porosidade da partícula ( $\varepsilon_p$ ).

Imagens foram capturadas usando um microscópio óptico Carl Zeiss mf-AKS 24 x 36 EXPOMET (Zeiss, Germany). A densidade foi determinada por picnometria usando picnômetros de 25 mL.

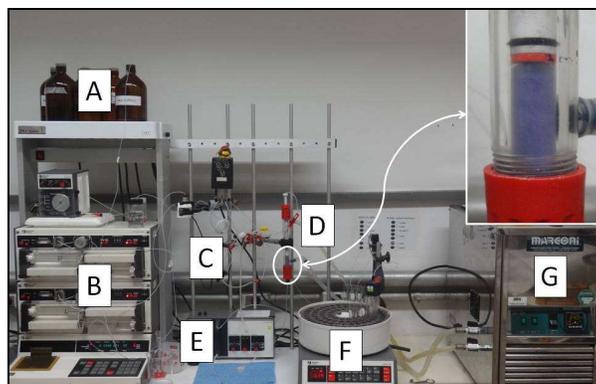
O diâmetro médio das partículas foi analisado em triplicata através da distribuição de tamanho de partículas obtida usando água destilada como meio dispersante em um equipamento de difração a laser Mastersizer 2000 (Malvern Instruments Ltd., UK) no Laboratório de Engenharia de Processos (DEA/FEA/UNICAMP), usando a teoria Fraunhofer, a partir da proporção volume/superfície média ( $d_p = d_{32} = \sum n_i d_i^3 / \sum n_i d_i^2$ ), onde  $n_i$  é o número de microcápsulas de diâmetro  $d_i$  (Perrechil et al., 2012).

A estrutura de poros foi avaliada através da técnica de porosimetria de mercúrio usando um porosímetro Micromeritics 9400 (Micromeritics Instrument Corporation, USA) no Laboratório de Engenharia Ambiental (FEQ/UNICAMP), com os seguintes parâmetros para as fases de baixa e alta pressão: pressão de evacuação = 50.000  $\mu\text{mHg}$ ; tempo de evacuação = 30 min; tempo de equilíbrio = 10 s. A porosidade da partícula foi calculada a partir da equação 5.1:

$$\varepsilon_p = 1 - \frac{\rho_{\text{bulk}}}{\rho_p} \quad (5.1)$$

## 5.2.6 CARACTERIZAÇÃO DO LEITO DE PARTÍCULAS

A porosidade do leito foi determinada pelo método do primeiro momento descrito por (Arnold et al., 1985). Este método consiste na análise da resposta obtida após um pulso de traçador na coluna, na presença e ausência de material adsorvente. *Blue dextran* de peso molecular 2000 kDa, na concentração de 0,5 % (p/v), foi utilizada como traçador. Uma coluna Pharmacia C10/20, com leito de 1,4 cm de altura e 1,0 cm de diâmetro, foi acoplada ao equipamento FPLC (*Fast Protein Liquid Chromatography* – Pharmacia LKB) (Figura 5.4). Com um detector UV ( $\lambda = 280$  nm) na saída da coluna, foram determinados perfis de eluição de *blue dextran*. Este procedimento foi adotado para diferentes vazões de alimentação e para os sistemas com e sem leito de LDH<sub>ME</sub>.



**Figura 5.4:** Sistema FPLC com coluna empacotada com partículas de LDH<sub>ME</sub>. (A) soluções; (B) sistema de bombas; (C) injeção (*loop*); (D) coluna encamisada; (E) detector UV; (F) coletor de frações; (G) banho termostatizado.

O primeiro momento para o leito, correspondente ao tempo médio de retenção do pico de traçador na coluna, foi calculado pela diferença dos primeiros momentos com e sem LDH<sub>ME</sub> para cada velocidade superficial (equação 5.2):

$$\mu = \mu^p - \mu^u = \frac{L}{v} [\varepsilon_B + (1 - \varepsilon_B) \varepsilon_p] \quad (5.2)$$

onde  $\mu$  é o primeiro momento (min) (os índices  $p$  e  $u$  correspondem ao leito empacotado e não empacotado com LDH<sub>ME</sub>, respectivamente),  $L$  a altura do leito (cm),  $v$  a velocidade superficial (cm/min),  $\varepsilon_B$  a porosidade do leito e  $\varepsilon_p$  a porosidade da partícula. Para uma substância não adsorvida no interior dos poros, a equação é reduzida e a porosidade do leito é determinada através da equação 5.3:

$$\mu = \frac{L}{v} \varepsilon_B \quad (5.3)$$

### 5.2.7 ENSAIOS DE ADSORÇÃO EM COLUNA DE LEITO FIXO

O aparato experimental foi o mesmo descrito no anterior (Figura 5.4). Foi utilizada uma coluna encamisada, com diâmetro interno  $d = 1,0$  cm e altura de leito  $L = 5,0$  cm, contendo as partículas do adsorvente LDH<sub>ME</sub>. Os ensaios foram realizados a 25°C utilizando o método de pulso cromatográfico com posterior gradiente salino para eluição das espécies: um pulso de volume  $v_i = 0,5$  mL de amostras contendo CA foi injetado na coluna através da passagem contínua e descendente da fase móvel (água destilada).

Inicialmente foram obtidos os perfis de injeções de CA (ensaios A5 a A17) em diferentes condições a fim de adaptar o condicionamento da coluna (lavagem da coluna *overnight* numa vazão de 0,10 mL/min) e selecionar um eluente mais adequado para o gradiente salino, levando em consideração a porcentagem de massa de recuperada de CA (% RM<sub>CA</sub>). Foram testados diferentes sais cloreto de cálcio, acetato de sódio e gluconato de sódio como eluentes. Em todos os casos, tanto no condicionamento como na eluição, as fases móveis continham íons Ca<sup>2+</sup> (CaCl<sub>2</sub> 0,02 M) e azida (0,005 M), evitando com isso a deformação das microesferas

(através da captura de  $\text{Ca}^{+2}$ ) e contaminação microbiológica. O perfil de eluição do CA em leite empacotado com microesferas de ALG (sem LDH) também foi obtido como um branco (A14). Ensaios foram feitos com as melhores condições de vazão e comprimento de leito para separação de CA e aminoácidos tirosina (TYR) e prolina (PRO) (A22), determinadas previamente (Forte et al., 2013a), a fim de avaliar a separação em relação a esses compostos.

Foram injetadas soluções modelos de CA (concentração inicial  $C_{\text{CA},0} = 4 \text{ g/L}$ ), e misturas CA+TYR+PRO ( $C_{\text{CA},0} = 4 \text{ g/L}$ ,  $C_{\text{TYR},0} = 0,1 \text{ g/L}$  e  $C_{\text{PRO},0} = 0,1 \text{ g/L}$ ), simulando dessa forma as condições do caldo fermentativo (Silva et al., 2012). Em ambos os casos o pH das amostras foi controlado em 6,2. As condições experimentais para cada experimento estão detalhadas na Tabela 5.1. Os primeiros momentos foram calculados segundo a equação 5.4,

$$\mu = \frac{\sum_{i=1}^n C_i t_i \Delta t_i}{\sum_{i=1}^n C_i \Delta t_i} \quad (5.4)$$

onde  $\mu$  é o primeiro momento para cada componente,  $C_i$  é a concentração do componente na fração  $i$ ,  $t_i$  o respectivo tempo e  $\Delta t_i$  o intervalo de amostragem.

O fator de purificação do CA referente a cada aminoácido (TYR e PRO) segundo a equação 5.5.

$$PF = \frac{C_{\text{CA}} C_{\text{TYR/PRO},0}}{C_{\text{CA},0} C_{\text{TYR/PRO}}} \quad (5.5)$$

onde PF é o fator de purificação do CA referente a cada aminoácido separadamente,  $C_{\text{CA},0}$  é a concentração inicial de CA inicial,  $C_{\text{CA}}$  é a concentração de CA em cada ponto,  $C_{\text{TYR/PRO},0}$  é a concentração inicial de TYR ou PRO e  $C_{\text{TYR/PRO}}$  é a concentração de TYR ou PRO em cada ponto.

**Tabela 5.1:** Condições experimentais dos ensaios em coluna de leito fixo de LD<sub>HME</sub>.

T = 25°C; L = 5,0 cm; V<sub>i</sub> = 0,5 mL.

Ensaio	Q (mL/min)	Eluente	C <sub>Eluente, 100%</sub> (M)	pH <sub>Eluente</sub>	Overnight (0,2 M; pH 6,0)	RM <sub>CA</sub> (%)
*A14	0,23	CaCl <sub>2</sub>	1,0	6,0	CaCl <sub>2</sub>	90
A5		CaCl <sub>2</sub>	1,0 / 2,0	6,0	CaCl <sub>2</sub>	16
A8		Acetato-Na	0,5	6,5	CaCl <sub>2</sub>	7
A9		Gluconato-Na	0,5	7,0	CaCl <sub>2</sub>	8
A11		Acetato-Na	1,0	6,5	Acetato-Na	21
A16		Acetato-Na	0,5	4,0	Acetato-Na	15
A17		Acetato-Na	1,0	5,0	Acetato-Na	17
A22	0,72	Acetato-Na	1,0	6,5	Acetato-Na	40

\* Branco (microgéis de ALG).

## 5.2.8 ANÁLISE DE ÁCIDO CLAVULÂNICO E AMINOÁCIDOS

As concentrações de CA foram determinadas por análise espectrofotométrica do produto da derivatização com imidazol (60 g/L, pH 6,8) segundo o método clássico descrito por (Bird et al., 1982). Para a curva de calibração foram usadas soluções padrões de CA (na forma de clavulanato de potássio) a partir do produto farmacêutico Clavulin<sup>®</sup>. As leituras foram realizadas ( $\lambda = 312$  nm) em espectrofotômetro DU<sup>®</sup> 640 (Beckman Coulter<sup>TM</sup>, USA).

As análises de TYR foram realizadas por leitura direta no espectrofotômetro ( $\lambda = 280$  nm), uma vez que a PRO não absorve nesse comprimento de onda. A confirmação da presença de TYR nas amostras foi

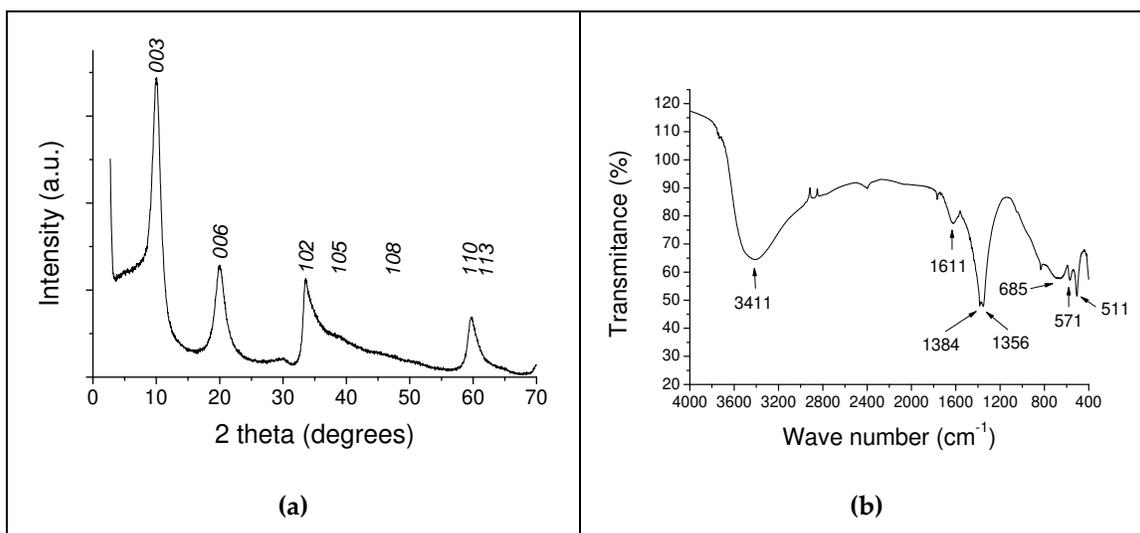
verificada através dos espectros de absorção no ultravioleta ( $190 < \lambda < 400$  nm). As concentrações de PRO foram determinadas pela reação com ninidrina na presença de ácido acético glacial e ácido fosfórico. Para isso, foi feita uma adaptação da metodologia descrita por (Bates et al., 1973) e (Torello and Rice, 1986) para extratos de plantas: 0,5 mL de amostra foi reagido com 0,5 mL de ácido-ninidrina (1,25 g de ninidrina diluídos em 30 mL de ácido acético glacial e 20 mL de ácido fosfórico 6 M, estocado a 4°C esse reagente é estável por 24 h) e 0,5 mL de ácido acético glacial a 100°C por durante 1 h. A reação foi então parada com a imersão das amostras em banho de gelo e a concentração de PRO total foi determinada pela leitura em espectrofotômetro a  $\lambda = 520$  nm.

### 5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 5.3.1 PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS ADSORVENTES LDH

O perfil cristalino dos LDH sintetizados pode ser analisado através dos difratogramas PXRD mostrados na Figura 5.5a. Podemos visualizar a formação de uma estrutura bem cristalizada cujos picos são característicos dos LDH formados ( $Zn_2Cr-NO_3$ ). A distância interlamelar calculada a partir do espaço  $d_{003}$  ( $d = 1,5418/2\text{sen}\theta$ ) para o LDH ( $Zn_2Cr-NO_3$ ) foi 0,98 nm, a qual corresponde à presença do grupo nitrato no espaço interlamelar (Tang et al., 2008). O espectro FTIR do LDH está ilustrado na Figura 5.5b, a partir do qual pode ser identificado um perfil característico da fase  $Zn_2Cr-NO_3$ . A ampla e intensa banda em  $3411\text{ cm}^{-1}$  pode ser associada à superposição de vibrações de deformação de moléculas de água adsorvidas fisicamente e vibrações de grupos estruturais OH. Os sinais em  $1611\text{ cm}^{-1}$  são devido a moléculas de água dos espaços interlamelares. A forte banda a  $1384\text{ cm}^{-1}$  correspondente ao ânion intercalado é característica do grupo

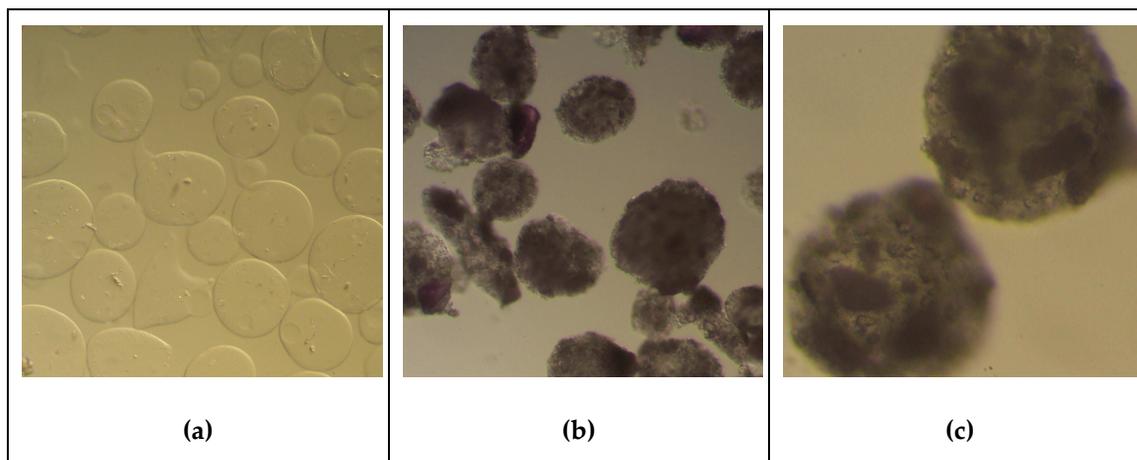
nitrato (Goh et al., 2008; Tang et al., 2008; Islam and Patel, 2010). O sinal a  $1356\text{ cm}^{-1}$  pode ser estar associado ao estiramento  $\nu_3$  de íons carbonato possivelmente adsorvidos durante a secagem. As demais bandas ( $685$ ,  $571$  e  $511\text{ cm}^{-1}$ ) estão relacionadas às ligações envolvendo os metais presentes (M-O ou O-M-O, onde M = Zn, Cr) (Rojas et al., 2010).



**Figura 5.5:** Caracterização dos hidróxidos duplos lamelares produzidos: (a) difratograma PXRD; (b) espectroscopia na região do infravermelho FTIR.

### 5.3.2 CARACTERIZAÇÃO DAS PARTÍCULAS DE LDH<sub>ME</sub>

As imagens dos microgéis de ALG e das micropartículas LDH<sub>ME</sub> estão apresentadas na Figura 5.6. É possível identificar partículas com tamanhos e formas esféricas consideravelmente uniformes. Através dessas imagens, a microencapsulação dos cristais LDH usando géis de ALG como suporte pode ser confirmada. As propriedades calculadas nos diferentes métodos de caracterização das partículas LDH<sub>ME</sub> estão apresentadas na Tabela 5.2. A densidade medida foi  $\rho_p = 2,17\text{ g/cm}^3$ .

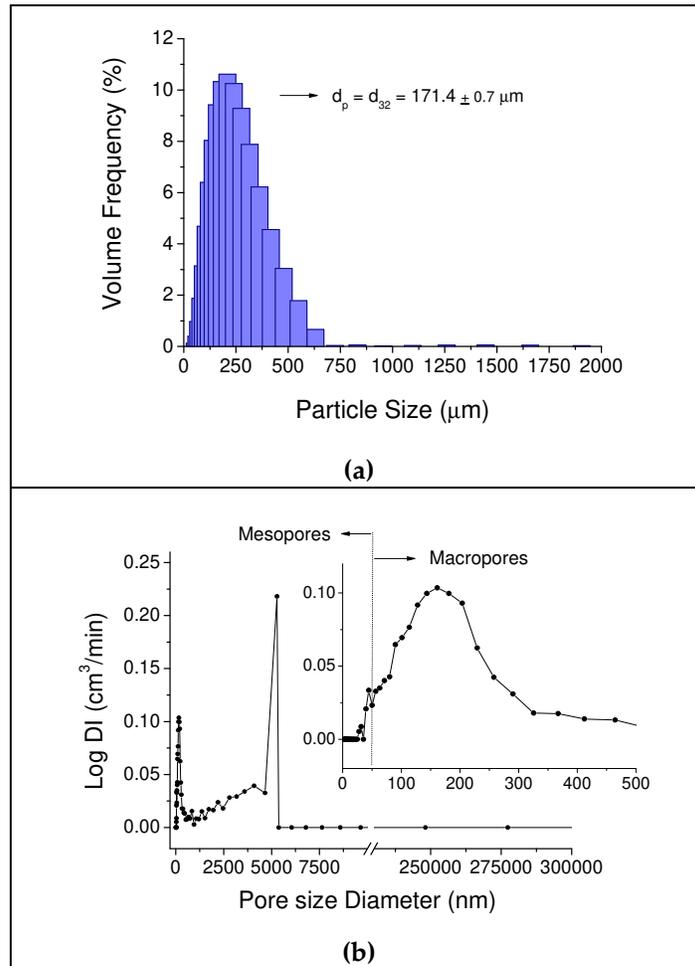


**Figura 5.6:** Imagens das micropartículas formadas: (a) alginato (ALG); (b e c) hidróxidos duplos lamelares microencapsulados em alginato (LDH<sub>ME</sub>).

**Tabela 5.2:** Caracterização das microcápsulas LDH<sub>ME</sub> quanto ao diâmetro médio das partículas ( $d_p$ ), diâmetro médio dos poros ( $d_{pore}$ ), densidades aparente ( $\rho_{bulk}$ ) e real ( $\rho_p$ ) e porosidade da partícula ( $\epsilon_p$ ).

$d_p$ ( $\mu\text{m}$ )	$d_{pore}$ (nm)	$\rho_{bulk}$ ( $\text{g}/\text{cm}^3$ )	$\rho_p$ ( $\text{g}/\text{cm}^3$ )	$\epsilon_p = 1 - \frac{\rho_{bulk}}{\rho_p}$
171,4	154,1	0,63	2,17	0,71

O diâmetro médio das partículas foi calculado através da distribuição de tamanhos mostrada na Figura 5.7a. A partir dessa análise, é possível constatar a uniformidade dos diâmetros: apenas 10 % das partículas são menores 102  $\mu\text{m}$  e 90 % são menores que 366  $\mu\text{m}$ . O diâmetro médio calculado foi  $d_p = 171,4 \mu\text{m}$ . Outros autores encontraram diâmetros semelhantes (188 a 231  $\mu\text{m}$ ) usando as mesmas condições em um sistema semelhante, porém com pectina como biopolímero, variando de 2 a 12 % (p/p) (Souza et al., 2012). Um parâmetro bastante importante na definição desses diâmetros é o pH.



**Figura 5.7:** Caracterização das micropartículas LDHME: (a) distribuição do tamanho de partículas; (b) distribuição porosimétrica (incremento de intrusão em função do diâmetro de poros).

Pesquisadores, usando sistemas com carragena como biopolímero, observaram que o pH influenciou mais no diâmetro das micropartículas formadas do que o diâmetro do bico aspersor, reportando diâmetros de 90 e 120 μm para pH 7,0 e 3,5, respectivamente (Perrechil et al., 2012).

O resultado da análise de porosimetria de mercúrio está mostrado na Figura 5.7b. As microesferas LDHME são constituídas basicamente por macroporos ( $d_{\text{pore}} > 50 \text{ nm}$ ). Apesar dessa técnica não analisar a ocorrência de microporos, ela

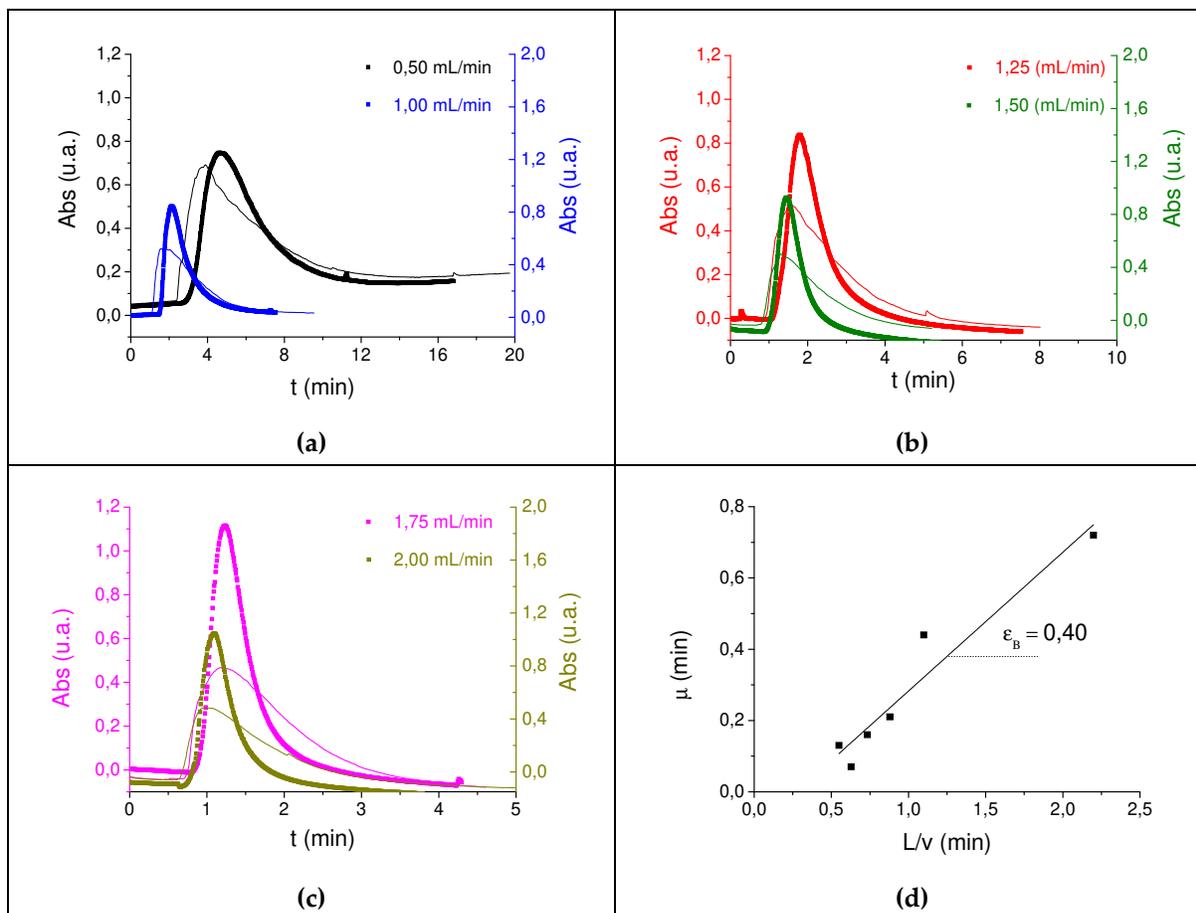
pode ser usada para a determinação da densidade aparente tornando, dessa forma, possível a determinação da porosidade da partícula. Os valores calculados foram:  $d_{\text{pore}} = 154,1 \text{ nm}$ ,  $\rho_{\text{bulk}} = 0,63 \text{ g/cm}^3$  e  $\epsilon_p = 0,71$ . Existem trabalhos que usam sistemas cromatográficos relatando valores de  $\epsilon_p$  entre 0,40 e 0,85 (Luz et al., 2008; Moraes et al., 2009; Burkert et al., 2011). É esperado que a porosidade de LDH<sub>ME</sub> encontrada nesse trabalho seja mais elevada devido à rede macroporosa dos géis de ALG.

### 5.3.3 POROSIDADE DO LEITO

Os resultados das injeções para ambos os sistemas (empacotado e não empacotado), estão apresentados na Tabela 5.3. Os perfis de eluição de *blue dextran* nas diferentes vazões e o ajuste dos dados à reta para o cálculo da porosidade do leito ( $\epsilon_B$ ), estão ilustrados na Figura 5.8.

**Tabela 5.3:** Parâmetros operacionais e resultados dos primeiros momentos dos sistemas com LDH<sub>ME</sub> ( $\mu^p$ ), sem LDH<sub>ME</sub> ( $\mu^u$ ), e do leito ( $\mu = \mu^p - \mu^u$ ).  $d = 1,0 \text{ cm}$ ;  $L = 1,4 \text{ cm}$ .

Q (cm <sup>3</sup> /min)	v (cm/min)	L/v (min)	$\mu^p$ (min)	$\mu^u$ (min)	$\mu$ (min)	$\epsilon_B$
0,50	0,64	2,20	4,61	3,89	0,72	0,40
1,00	1,27	1,10	2,12	1,68	0,44	
1,25	1,59	0,88	1,79	1,58	0,21	
1,50	1,91	0,73	1,46	1,30	0,16	
1,75	2,23	0,63	1,24	1,17	0,07	
2,00	2,55	0,55	1,10	0,97	0,13	



**Figura 5.8:** Perfis de eluição do traçador nas diferentes vazões (a) 0,50 e 1,00 mL/min; (b) 1,25 e 1,50 mL/min; (c) 1,75 e 2,00 mL/min; (d) ajuste do primeiro momento do leito para diferentes velocidades superficiais ( $R^2 = 0,92$ ).

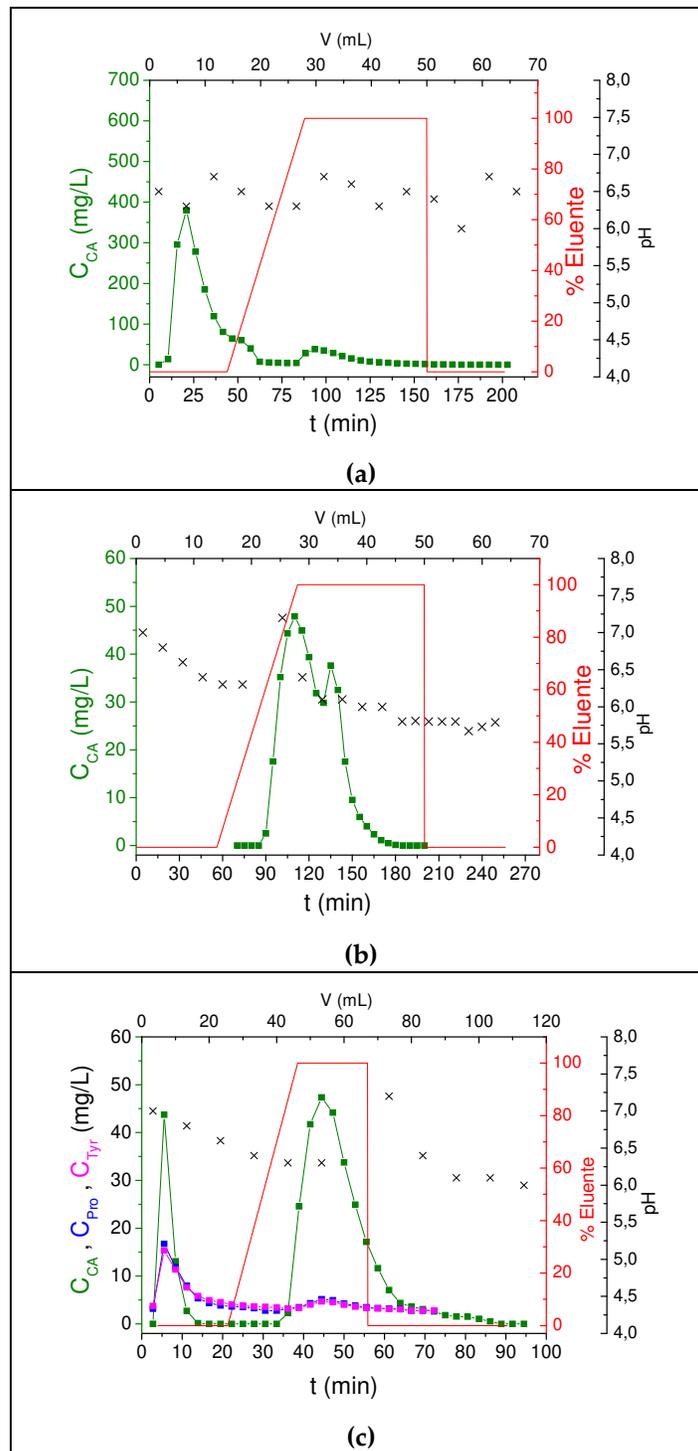
A porosidade calculada foi  $\epsilon_B = 0,40$ . Esta propriedade está diretamente relacionada com o tamanho das partículas. Alguns trabalhos, que usaram resinas com diâmetros relativamente semelhantes (entre 160 e 320  $\mu\text{m}$ ), encontraram valores similares (Luz et al., 2008).

#### 5.3.4 APLICAÇÃO DAS MICROPARTÍCULAS LDH<sub>ME</sub> NA SEPARAÇÃO DE CA

Foram realizadas ao todo 22 injeções, incluindo: verificação preliminar do perfil de eluição de CA em microgéis de ALG, para conhecimento prévio do

comportamento quanto à adsorção e recuperação do CA (A14); adaptação do sistema, condicionamento da coluna antes dos ensaios e seleção do sal a ser usado como eluente no gradiente salino (A1-13 e A15-18); verificação da separação de CA e aminoácidos (TYR e PRO) a partir de soluções mistas. Segundo estudos prévios (Silva et al., 2012), são esses os contaminantes em potencial a serem separados do CA. As condições experimentais dos resultados mais significativos estão representadas na Tabela 5.1.

Em todos os ensaios, os valores de pH se mantiveram regularmente entre 6,0 e 7,0, o que é bom do ponto de vista do processo uma vez que é nessa faixa que a molécula de CA encontra-se em sua forma mais estável (Forte et al., 2012). A partir da Figura 5.9a, usando o leito com ALG (A14), verificamos um tempo de ruptura  $t_b = 10$  min. Praticamente todo o CA injetado na coluna ( $RM_{CA} = 80\%$ ) sai nos primeiros 60 min, com tempo de retenção médio  $\mu_{CA,1} = 28$  min, antes mesmo do gradiente salino. O segundo pico é observado na eluição,  $\mu_{CA,2} = 105$  min ( $RM_{CA} = 10\%$ ), evidenciando que as moléculas de CA não são adsorvidas nas microesferas de ALG, já que a pequena diferença de massa pode estar associada a erros analíticos assim como a uma eventual degradação da molécula. Em relação aos experimentos usando leito de LDH<sub>ME</sub>, os melhores resultados foram obtidos com as condições de A11 (Figura 5.9b), com uma recuperação de 21% (Tabela 5.1). Assim, foi esse o protocolo adotado nos ensaios de separação: condicionamento da coluna *overnight* usando acetato de sódio (0,2 M e pH 6,0) e acetato de sódio (1,0 M e pH 6,5) como eluente do gradiente salino. Foi decidido usar uma vazão  $Q = 0,72$  mL/min, levando em consideração a baixa estabilidade dessa molécula e que essa vazão é mais satisfatória quanto ao aproveitamento da capacidade da coluna e a recuperação de CA (Forte et al., 2013a).



**Figura 5.9:** Perfis cromatográficos dos ensaios usando leito fixo de LDH<sub>ME</sub>: (a) microgéis de ALG (A14); (b) micropartículas LDH<sub>ME</sub> (A11); (c) separação de CA e aminoácidos (TYR e PRO) com micropartículas LDH<sub>ME</sub> (A22).

Na Figura 5.9c estão apresentados os resultados da injeção da amostra contendo mistura (CA+TYR+PRO). Primeiramente em relação aos valores de pH observados na saída coluna, verifica-se que existe pequenas oscilações entre 6,0 e 7,0, o que pode ser justificado tanto pela interação iônica entre o suporte sólido e as espécies presentes na fase fluida como também pelo “efeito Donnan”. Segundo essa teoria, o pH do micro ambiente de um trocador de íons não é o mesmo da solução utilizada durante a eluição, podendo haver atração ou expelição de prótons na superfície da matriz (Scopes, 1982). São observados dois estágios nos perfis cromatográficos: um primeiro onde há a exaustão (ruptura) das espécies com a simples passagem da fase móvel (água destilada) e um segunda na etapa de eluição com o gradiente salino. É observado um tempo de ruptura  $t_b = 5$  min e que 8 % da CA injetado saem no primeiro estágio, em um tempo de retenção  $\mu_{CA,1} = 6$  min. Nesse estágio, observa-se a baixa adsorção dos aminoácidos durante a passagem da solução contendo CA, a maioria dos aminoácidos injetados é detectada na saída da coluna:  $RM_{TYR} = 80$  % e  $RM_{PRO} = 75$  %, com tempos de retenção  $\mu_{TYR,1} = 11$  min e  $\mu_{PRO,1} = 10$  min, o que indica uma boa separação entre o CA e essas moléculas. Outros autores observaram um efeito similar com uso de resinas de troca aniônica Amberlite IRA 400Cl e Streamline QXL (Silva et al., 2012).

Na etapa de eluição, a exaustão de CA foi mais significativa em um tempo de retenção  $\mu_{CA,2} = 49$  min. O restante dos aminoácidos são eluídos em um mesmo tempo de retenção ( $\mu_{TYR,2} = \mu_{PRO,2} = 48$  min) porém essas quantidades são relativamente menores. As recuperações nesse estágio foram  $RM_{CA} = 32$  %,  $RM_{TYR} = 20$  % e  $RM_{PRO} = 25$  %, levando a um grau de purificação de 93 %. Os fatores de purificação (PF) estão apresentados na Tabela 5.4. Os valores dos pontos mais significativos foram maiores que 1,0, chegando a valores superiores a 2,0.

**Tabela 5.4:** Fatores de purificação (PF) do CA referentes à TYR e PRO dos pontos mais significativos do perfil cromatográfico em leito de LDH<sub>ME</sub>.

<b>t (min)</b>	<b>PF<sub>TYR</sub></b>	<b>PF<sub>PRO</sub></b>	<b>t (min)</b>	<b>PF<sub>TYR</sub></b>	<b>PF<sub>PRO</sub></b>
38,9	2,32	1,88	50,0	1,51	1,23
41,7	1,79	1,45	52,8	1,64	1,33
44,4	1,33	1,08	55,6	1,65	1,34
47,2	1,35	1,10	58,3	1,50	1,22

Houve uma boa separação do CA em relação aos aminoácidos estudados, porém a recuperação de CA ainda merece atenção. Pesquisadores têm observado efeitos similares de degradação dessa molécula no desenvolvimento de processos de separação usando técnicas de adsorção. Esse fenômeno é decorrente de interações irreversíveis com o suporte, causando a degradação de CA no adsorvente e assim a recuperação é baixa (Mayer et al., 1996). Estudos têm reportado degradações de até 40 % com resinas aniônicas, porém usando altas vazões (5 mL/min) (Silva et al., 2012). As recuperações podem ser melhoradas com o uso de vazões mais altas, baixas temperaturas e uso de tampões como fase móvel.

## 5.4 CONCLUSÕES

A partir dos resultados apresentados, podemos concluir que a metodologia de microencapsulação empregada possibilita a utilização de hidróxidos duplos lamelares em leitos empacotados. As microesferas apresentaram características uniformes e viabilizaram o fluxo ao longo da coluna. Os LDH representam uma boa alternativa nos processos de separação de CA já que foram obtidos bons

resultados quanto à separação dessa molécula e aminoácidos, levando os fatores de purificação a valores de 2,32 e a um grau de pureza das soluções de 93 %.

## 5.5 AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Laboratório de Microestrutura de Alimentos (DEPAN/FEA/UNICAMP), Laboratório de Engenharia de Processos (DEA/FEA/UNICAMP) e ao Laboratório de Engenharia Ambiental (DDPP/FEQ/UNICAMP) pela disponibilidade dos equipamentos para fabricação e caracterização das micropartículas. Esta pesquisa foi financiada pela FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) – processo n° 2008/57298-3 e pela CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) – processo n° BEX 6843/10-7.

## 5.6 REFERÊNCIAS

- ANNAN, N. T.; BORZA, A. D.; HANSEN, L. T. Encapsulation in alginate-coated gelatin microspheres improves survival of the probiotic *Bifidobacterium adolescentis* 15703T during exposure to simulated gastro-intestinal conditions. **Food Research International**, v. 41, p. 184-193, 2008.
- ARNOLD, F. H.; BLANCH, H. W.; WILKE, C. R. Liquid-Chromatography Plate Height Equations. **J Chromatogr**, v. 330, p. 159-166, 1985.
- 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. **Biochem Eng J**, v. 14, p. 19-26, 2003.
- BATES, L. S.; WALDREN, R. P.; TEARE, I. D. Rapid Determination of Free Proline for Water-Stress Studies. **Plant Soil**, v. 39, p. 205-207, 1973.
- BELTER, P. A.; CUSSLER, E. L.; HU, W.-S. **Bioseparations: downstream processing for biotechnology**. New York: Wiley-Interscience, 1988.

- BERSANETTI, P. A.; ALMEIDA, R. M. R. G.; BARBOZA, M.; ARAUJO, M. L. G.; HOKKA, C. O. Kinetic studies on clavulanic acid degradation. **Biochem Eng J**, v. 23, p. 31-36, 2005.
- BIRD, A. E.; BELLIS, J. M.; GASSON, B. C. Spectrophotometric Assay of Clavulanic Acid by Reaction with Imidazole. **Analyst**, v. 107, p. 1241-1245, 1982.
- BURKERT, C. A. V.; BARBOSA, G. N. O.; MAZUTTI, M. A.; MAUGERI, F. Mathematical modeling and experimental breakthrough curves of cephalosporin C adsorption in a fixed-bed column. **Process Biochem**, v. 46, p. 1270-1277, 2011.
- CUEL, M.; BARBOZA, M.; HOKKA, C.; KWONG, W. Heterogeneous Model of the Process of Clavulanic Acid Purification by Ionic Exchange in a Fixed-Bed Column. **Chemical Product and Process Modeling**, v. 6, p. article 1: 1-18, 2011.
- FORANO, C.; HIBINO, T.; LEROUX, F.; TAVIOT-GUÉHO, C. Layered Double Hydroxides. In: BERGAYA, F.; THENG, B. K. G.; LAGALY, G. **Handbook of Clay Science**, Amsterdam: Elsevier, 2006, p. 1021-1095.
- FORTE, M. B. S.; ELIAS, E. C. L.; PASTORE, H. O.; MAUGERI, F.; RODRIGUES, M. I. Evaluation of Clavulanic Acid Adsorption in MgAl-layered Double Hydroxides: Kinetic, Equilibrium and Thermodynamic Studies. **Adsorpt Sci Technol**, v. 30, p. 65-80, 2012.
- FORTE, M. B. S.; RODRIGUES, M. I.; MAUGERI FILHO, F. Clavulanic acid adsorption studies in zeolites. **Adsorpt. Sci. Technol.**, v. 29, p. 391-404, 2011.
- FORTE, M. B. S.; SCHWAAB, M.; MAZUTTI, M. A.; TAVIOT-GUÉHO, C.; LEROUX, F.; RODRIGUES, M. I.; MAUGERI FILHO, F. Modelagem matemática da adsorção de ácido clavulânico através de curvas de ruptura em hidróxidos duplos lamelares microencapsulados em géis de alginato. **Cap. 6 desta Tese**, v. . p. . 2013a.
- FORTE, M. B. S.; TAVIOT-GUÉHO, C.; LEROUX, F.; RODRIGUES, M. I.; MAUGERI FILHO, F. Intercalation and adsorption of clavulanic acid in layered double hydroxides. **Food Bioprod. Process.**, v. Cap. 4 desta Tese (In review), p. . 2013b.
- GOH, K. H.; LIM, T. T.; DONG, Z. Application of layered double hydroxides for removal of oxyanions: A review. **Water Res**, v. 42, p. 1343-1368, 2008.

- ISLAM, M. and PATEL, R. Synthesis and physicochemical characterization of Zn/Al chloride layered double hydroxide and evaluation of its nitrate removal efficiency. **Desalination**, v. 256, p. 120-128, 2010.
- KUHN, R. C. and MAUGERI, F. Purification of fructooligosaccharides in an activated charcoal fixed bed column. **New Biotechnol**, v. 27, p. 862-869, 2010.
- LEROUX, F.; GACHON, J.; BESSE, J.-P. Biopolymer immobilization during the crystalline growth of layered double hydroxide. **J. Solid State Chem.**, v. 177, p. 245-250, 2004.
- LUZ, D. A.; RODRIGUES, A. K. O.; SILVA, F. R. C.; TORRES, A. E. B.; CAVALCANTE, C. L.; BRITO, E. S.; AZEVEDO, D. C. S. Adsorptive separation of fructose and glucose from an agroindustrial waste of cashew industry. **Bioresource Technol**, v. 99, p. 2455-2465, 2008.
- MARANGONI, R.; BOUHENT, M.; TAVIOT-GUÉHO, C.; WYPYCH, F.; LEROUX, F. Zn<sub>2</sub>Al layered double hydroxides intercalated and adsorbed with anionic blue dyes: A physico-chemical characterization. **J. Colloid Interface Sci.**, v. 333, p. 120-127, 2009.
- MAYER, A. F.; ANSPACH, F. B.; DECKWER, W. D. Purification of clavulanic acid by ion-pairing systems. **Bioseparation**, v. 6, p. 25-39, 1996.
- MORAES, C. C.; MAZUTTI, M. A.; RODRIGUES, M. I.; MAUGERI, F.; KALIL, S. J. Mathematical modeling and simulation of inulinase adsorption in expanded bed column. **J Chromatogr A**, v. 1216, p. 4395-4401, 2009.
- NEWMAN, A. C. D. **Chemistry of Clays and Clay Minerals**. New York: Wiley-Interscience, 1987.
- PERRECHIL, F. A.; SATO, A. C. K.; CUNHA, R. L. kappa-Carrageenan-sodium caseinate microgel production by atomization: Critical analysis of the experimental procedure. **J Food Eng**, v. 104, p. 123-133, 2011.
- PERRECHIL, F. A.; VILELA, J. A. P.; GUERREIRO, L. M. R.; CUNHA, R. L. Development of Na-CN-kappa-carrageenan Microbeads for the Encapsulation of Lipophilic Compounds. **Food Biophys**, v. 7, p. 264-275, 2012.
- ROJAS, R.; BARRIGA, C.; DE PAULI, C. P.; AVENA, M. J. Influence of carbonate intercalation in the surface-charging behavior of Zn-Cr layered double hydroxides. **Mater Chem Phys**, v. 119, p. 303-308, 2010.

- SANTOS, V. C.; PEREIRA, J. F. B.; HAGA, R. B.; RANGEL-YAGUI, C. O.; TEIXEIRA, J. A. C.; CONVERTI, A.; PESSOA, A. Stability of clavulanic acid under variable pH, ionic strength and temperature conditions. A new kinetic approach. **Biochem Eng J**, v. 45, p. 89-93, 2009.
- SAUDAGAR, P. S.; SURVASE, S. A.; SINGHAL, R. S. Clavulanic acid: A review. **Biotechnol Adv**, v. 26, p. 335-351, 2008.
- SCOPES, R. K. **Protein purification**. New York: Springer-Verlag, 1982.
- SILVA, C. S.; CUEL, M. F.; BARRETO, V. O.; KWONG, W. H.; HOKKA, C. O.; BARBOZA, M. Separation of clavulanic acid from fermented broth of amino acids by an aqueous two-phase system and ion-exchange adsorption. **New Biotechnol**, v. 29, p. 428-431, 2012.
- SOUZA, F. N.; GEBARA, C.; RIBEIRO, M. C. E.; CHAVES, K. S.; GIGANTE, M. L.; GROSSO, C. R. F. Production and characterization of microparticles containing pectin and whey proteins. **Food Research International**, v. 49, p. 560-566, 2012.
- TANG, P.; XU, X.; LIN, Y.; LI, D. Enhancement of the Thermo- and Photostability of an Anionic Dye by Intercalation in a Zinc-Aluminum Layered Double Hydroxide Host. **Ind. Eng. Chem. Res.**, v. 47, p. 2478-2483, 2008.
- TAVIOT-GUÉHO, C.; HALMA, M.; CHARRADI, K.; FORANO, C.; MOUSTY, C. Structural and electrochemical characterization of metallo-porphyrins intercalated into ZnCr-layered double hydroxides: some evidence of dimer formation. **New J. Chem.**, v. 35, p. 1898-1905, 2011.
- TORELLO, W. A. and RICE, L. A. Effects of NaCl Stress on Proline and Cation Accumulation in Salt Sensitive and Tolerant Turfgrasses. **Plant Soil**, v. 93, p. 241-247, 1986.
- TROUTIER-THUILLIEZ, A.-L.; TAVIOT-GUÉHO, C.; CELLIER, J.; HINTZEBRUENING, H.; LEROUX, F. Layered particle-based polymer composites for coatings: Part I. Evaluation of layered double hydroxides. **Prog. Org. Coat.**, v. 64, p. 182-192, 2009.
- YANG, L.; DADWHAL, M.; SHAHRIVARI, Z.; OSTWAL, M.; LIU, P. K. T.; SAHIMI, M.; TSOTSIS, T. T. Adsorption of arsenic on layered double hydroxides: Effect of the particle size. **Ind Eng Chem Res**, v. 45, p. 4742-4751, 2006.

ZIMET, P. and LIVNEY, Y. D. Beta-lactoglobulin and its nanocomplexes with pectin as vehicles for omega-3 polyunsaturated fatty acids. **Food Hydrocolloid**, v. 23, p. 1120-1126, 2009.

## CAPÍTULO 6

**Modelagem matemática da adsorção de ácido clavulânico  
através de curvas de ruptura em hidróxidos duplos  
lamelares microencapsulados em géis de alginato**

*Artigo em preparação para submissão.*



**Modelagem matemática da adsorção de ácido clavulânico através de curvas de ruptura em hidróxidos duplos lamelares microencapsulados em géis de alginato**

**Marcus Bruno Soares Forte<sup>1\*</sup>, Marcio Schwaab<sup>2</sup>, Marcio Antonio Mazutti<sup>2</sup>,  
Christine Taviot-Guého<sup>3</sup>, Fabrice Leroux<sup>3</sup>, Maria Isabel Rodrigues<sup>1</sup> e  
Francisco Maugeri Filho<sup>1</sup>**

(1) *Laboratório de Engenharia de Bioprocessos, Departamento de Engenharia de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), R. Monteiro Lobato, 80, Campinas-SP, 13083-862, Brasil.*

(2) *Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de Santa Maria, Av. Roraima, 1000, Santa Maria-RS, 97105-900, Brasil.*

(3) *Clermont Université, Université Blaise Pascal, Institut de Chimie de Clermont-Ferrand, BP 10448, F-63000 CLERMONT-FERRAND; CNRS, UMR 6296, ICCF, F-63171 AUBIERE*

**RESUMO**

Este estudo apresenta o desenvolvimento de um modelo matemático para adsorção de ácido clavulânico (CA) em coluna de leito fixo, empacotada com partículas de argilas aniônicas microencapsuladas em géis de alginato (LDH<sub>ME</sub>). A

aplicação do algoritmo *Particle Swarm Optimization* (PSO) para estimar os parâmetros foi considerada. Curvas de ruptura foram obtidas experimentalmente e o sistema foi avaliado em relação aos tempos de operação assim como eficiências e produtividades em função de variações simultâneas das condições experimentais, vazão (Q) e altura de leito (L), através de um delineamento composto central rotacional (DCCR). A vazão foi avaliada no intervalo de 0,19 a 0,82 mL/min e a altura do leito de 3,0 a 5,0 cm. Os máximos e mínimos para as respostas avaliadas foram: tempo de ruptura ( $15 < t_b < 104$  min), tempo de exaustão ( $111 < t_e < 590$  min), eficiência de recuperação de CA ( $\phi_{rec} \approx 98$  %), eficiência de utilização da coluna ( $16 < \phi_{col} < 62$  %) e produtividade ( $15 < P < 55$  kg/h). O algoritmo PSO se mostrou eficaz na estimação dos parâmetros do modelo proposto. Depois de validado experimentalmente em condições distintas das usadas na estimação, o modelo foi usado como ferramenta na otimização da adsorção de CA através de um DCCR, cujos resultados foram obtidos com simulações usando níveis superiores para as variáveis de entrada (Q de 0,80 a 1,50 mL/min e L de 7,0 a 10,0 cm). Esse procedimento foi considerado satisfatório já que houve diminuições consideráveis nos tempos de operação e aumentos nas respectivas eficiências e produtividades. As melhores condições de operação do sistema estudado para adsorção de CA foram: Q = 1,15 mL/min e L = 10,0 cm, cujas respostas foram:  $t_b = 24$  min,  $t_e = 110$  min,  $\phi_{rec} = 96$  %,  $\phi_{col} = 37$  % e P = 117 kg/h.

**Palavras-chave:** ácido clavulânico; hidróxidos duplos lamelares; adsorção; leito fixo; modelagem matemática; curvas de ruptura; planejamento fatorial.

## 6.1 INTRODUÇÃO

A biotecnologia pode ser considerada como o setor de maior ascensão nos últimos anos. No mundo inteiro, tanto no campo de pesquisa como na indústria, esforços têm sido direcionados na tentativa de um maior e mais eficiente aproveitamento dos recursos naturais, observados nas mais diversas áreas de aplicação, como o setor energético, alimentício, farmacêutico, agropecuário entre outros. Pesquisadores se dedicam a descobrir novas tecnologias e estratégias para o desenvolvimento de bioprocessos, sobretudo na etapa de *upstream*, compreendendo desde o isolamento, seleção, identificação e melhoramentos genéticos de micro-organismos até a otimização da produção e *scale-up*. No entanto, a etapa mais dispendiosa em termos econômicos e tecnológicos ainda é a etapa de separação e purificação (*downstream*) dos bioprodutos. Independentemente do organismo envolvido na produção, o material sintetizado é composto por uma mistura complexa contendo, além da biomolécula alvo, os mais variados tipos de moléculas, dependendo de cada caso. Sabe-se que essa etapa é responsável por no mínimo 50 % do custo total de produção de bioprodutos, podendo chegar a patamares mais elevados de até mais de 90 %, quando se processa produtos de alto valor agregado. Apesar de toda essa importância, os processos de *downstream* ainda compreendem um setor que pode ser considerado comparativamente carente.

Os processos de biosseparação podem ser idealizados em quatro grandes grupos: remoção de moléculas insolúveis, isolamento do produto, purificação e polimento (Belter et al., 1988). A adsorção caracteriza-se pelo transporte de um soluto (adsorbato) diluído em solução para um sólido (adsorvente). Essa técnica

tem recebido atenção especial em bioprocessos uma vez que biomoléculas podem ser adsorvidas seletivamente no interior de uma gama de materiais sólidos possibilitando a utilização dessas propriedades nas etapas de extração da molécula alvo (Luz et al., 2008; Silva et al., 2012).

O ácido clavulânico (CA) é um antibiótico beta-lactamâmico bastante utilizado na indústria farmacêutica devido a seu grande potencial como inibidor de beta-lactamases, enzimas que hidrolisam antibióticos beta-lactâmicos, como a penicilina e amoxicilina (Saudagar et al., 2008). Várias etapas são utilizadas na separação e purificação dessa molécula. É importante a seleção de um sistema adsorvente que seja seletivo em relação aos diferentes tipos de moléculas a serem adsorvidas e suas respectivas características quanto à carga iônica, tamanho molecular, polaridade, hidrofobicidade entre outros (Luz et al., 2008; Moraes et al., 2009; Kuhn and Maugeri, 2010; Forte et al., 2011; Forte et al., 2012; Silva et al., 2012). Observando isso, (Saudagar et al., 2008) ratificaram que para o desenvolvimento de um processo de adsorção ou separação de CA mais eficiente e seletivo, a cinética e equilíbrio de adsorção devem ser mais detalhadamente investigados e compreendidos. Porém, em bioprocessos, nem sempre é possível ou conveniente a realização laboriosa de um grande número de experimentos. Por esta razão, é importante o desenvolvimento da etapa de modelagem matemática do sistema com a estimação e otimização dos parâmetros do processo.

Uma estratégia bastante interessante na busca da economia em relação a quantidade de experimentos a serem realizados, é a modelagem matemática do processo. Essa ferramenta além de fornecer informações intrínsecas que, em um grande número de casos seriam inacessíveis, possibilita a posterior simulação do processo em condições operacionais diferentes das que foram utilizadas experimentalmente e, com isso, uma economia de material e tempo pode ser

viabilizada. Alguns autores tem utilizado essa estratégia no estudo e otimização em diversos processos cromatográficos de adsorção de açúcares (Luz et al., 2008) e antibióticos (Burkert et al., 2011) em colunas de leito fixo e de enzimas usando leito expandido (Moraes et al., 2009). Além disso, a metodologia de planejamento fatorial tem despertado o interesse dos pesquisadores. Essa ferramenta estatística se bem utilizada, respeitando-se as características do processo e o bom senso, pode ser muito útil para selecionar e/ou otimizar as variáveis mais relevantes, diminuindo a quantidade de ensaios em relação ao método tentativa e erro, além de permitir a avaliação do erro experimental, informação importantíssima para obter-se maior confiabilidade nos resultados, aliando maior rapidez e economia para se atingir os objetivos desejados (Rodrigues and Iemma, 2012).

Nesse contexto, o principal objetivo desse trabalho foi desenvolver um modelo matemático para simular as curvas de ruptura de CA em uma coluna de leito fixo, usando argilas aniônicas microencapsuladas em géis de alginato ( $LDH_{ME}$ ) como adsorventes. Inicialmente, várias curvas de ruptura foram obtidas experimentalmente a partir da matriz de um planejamento fatorial, o que possibilitou a definição dos melhores níveis das condições operacionais. Algumas dessas curvas foram usadas na estimação dos parâmetros do modelo, através do algoritmo *particle swarm optimization* (PSO), e outras foram usadas na validação. O modelo validado foi usado para simular a operação da coluna e as melhores condições operacionais para adsorção de CA em coluna de leito fixo de  $LDH_{ME}$  foi determinada.

## 6.2 METODOLOGIA

### 6.2.1 ADSORVENTES

Devido ao alto grau de intumescimento quando em solução aquosa, provocando obstrução do leito, os hidróxidos duplos lamelares (LDH) foram microencapsulados em géis de alginato viabilizando o uso das microcápsulas obtidas (LDH<sub>ME</sub>) em colunas empacotadas. As partículas LDH<sub>ME</sub> foram preparadas por gelificação iônica do biopolímero alginato de sódio (ALG) 2 % (p/p) em presença de CaCl<sub>2</sub> 2 % (p/p) e pH 4,0 a temperatura ambiente, misturada e homogeneizada aos os pós na razão de 15 % (p/v). As micropartículas LDH<sub>ME</sub> foram caracterizadas quanto à densidade,  $\rho_p$  (g<sub>partículas</sub>/cm<sup>3</sup><sub>partículas</sub>), diâmetro médio das partículas,  $d_p$  (μm), diâmetro médio de poros,  $d_{pore}$  (nm), densidade aparente,  $\rho_{bulk}$  (g<sub>sólido</sub>/cm<sup>3</sup><sub>partículas</sub>), porosidade da partícula,  $\epsilon_p$ , e porosidade do leito,  $\epsilon_B$ , (Tabela 6.1). A síntese dos LDH bem como preparação das partículas LDH<sub>ME</sub> e suas respectivas caracterizações foram mais bem detalhadas em estudos prévios (Forte et al., 2013a).

**Tabela 6.1:** Propriedades das partículas de LDH<sub>ME</sub>: diâmetro médio das partículas ( $d_p$ ), diâmetro médio dos poros ( $d_{pore}$ ), densidades aparente ( $\rho_{bulk}$ ) e real ( $\rho_p$ ), porosidade da partícula ( $\epsilon_p$ ) e porosidade do leito ( $\epsilon_B$ ).

$d_p$ (μm)	$d_{pore}$ (nm)	$\rho_{bulk}$ (g/cm <sup>3</sup> )	$\rho_p$ (g/cm <sup>3</sup> )	$\epsilon_p = 1 - \frac{\rho_{bulk}}{\rho_p}$	$\epsilon_B$
171,4	154,1	0,63	2,17	0,71	0,40

## 6.2.2 ENSAIOS EXPERIMENTAIS

Os experimentos foram realizados no equipamento FPLC (*Fast Protein Liquid Chromatography* – Pharmacia LKB). Foi utilizada uma coluna encamisada ( $T = 25^{\circ}\text{C}$ ) com diâmetro interno  $d = 1,0$  cm e diferentes alturas de leito,  $L$  (cm), contendo as partículas do adsorvente LDH<sub>ME</sub>. Soluções de CA ( $C_0 = 2500$  mg/L), obtidas pela diluição do produto farmacêutico Clavulin® em água destilada e pH ajustado em 6,5, foram injetadas continuamente com diferentes vazões,  $Q$  (mL/min), sendo as amostras coletadas na saída da coluna em intervalos de tempo definidos e a concentração de CA determinada. O comportamento do processo foi avaliado em função de  $Q$  e  $L$  através de planejamento fatorial.

## 6.2.3 ANÁLISE DE ÁCIDO CLAVULÂNICO

As concentrações de CA foram determinadas por análise espectrofotométrica do produto da derivatização com imidazol (60 g/L, pH 6,8) segundo o método clássico descrito por (Bird et al., 1982). Para a curva de calibração foram usadas soluções padrões de CA (na forma de clavulanato de potássio) a partir do produto farmacêutico Clavulin®. As leituras foram realizadas ( $\lambda = 312$  nm) em espectrofotômetro DU® 640 (Beckman Coulter™, USA).

## 6.2.4 AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO DO PROCESSO – DCCR EXPERIMENTAL

As curvas de ruptura do CA no leito de LDH<sub>ME</sub> foram avaliadas quanto ao tempo de ruptura,  $t_b$  (min), tempo de exaustão,  $t_e$  (min), eficiência de recuperação do soluto,  $\phi_{\text{rec}}$  (%), eficiência de utilização da coluna,  $\phi_{\text{col}}$  (%) e produtividade,  $P$  (kg/h), segundo um delineamento composto central rotacional (DCCR). Essa

técnica tem sido amplamente utilizada em otimizações de processos com a avaliação de múltiplas respostas em função de múltiplos fatores variados simultaneamente (Rodrigues and Iemma, 2012). Para isso, foi realizado um DCCR de 11 ensaios, em função de Q (mL/min) e L (cm) (variáveis independentes), tendo como respostas (variáveis dependentes)  $t_b$ ,  $t_e$ ,  $\phi_{rec}$ ,  $\phi_{col}$  e P, definidas nas equações 6.1 a 6.6. As condições experimentais em seus respectivos níveis codificados são mostradas na Tabela 6.2:

$$\phi_{rec} = \frac{M_b}{M_b + M_{lost}} = \frac{t_b - \int_0^{t_b} C/C_0 dt}{t_b} \quad (6.1)$$

$$\phi_{col} = \frac{M_b}{M_e} = \frac{t_b - \int_0^{t_b} C/C_0 dt}{t_e - \int_0^{t_e} C/C_0 dt} \quad (6.2)$$

$$M_b = C_0 v_z t_b - C_0 v_z \int_0^{t_b} C/C_0 dt \quad (6.3)$$

$$M_e = C_0 v_z t_e - C_0 v_z \int_0^{t_e} C/C_0 dt \quad (6.4)$$

$$M_{lost} = C_0 v_z \int_0^{t_b} C/C_0 dt \quad (6.5)$$

$$P = \frac{M_e}{t_e} \quad (6.6)$$

onde  $C_0$  e C são a concentração de CA em solução inicial e na saída da coluna, respectivamente,  $v_z$  a velocidade superficial da solução pela coluna,  $t_b$  e  $t_e$  os tempos em que a concentração de saída atinge, respectivamente, 10 e 90 % da

concentração de alimentação,  $M_b$ ,  $M_e$  e  $M_{lost}$  as quantidades de CA adsorvidas em  $t_b$ ,  $t_e$ , e perdida no efluente, respectivamente (Burkert, 1998).

**Tabela 6.2:** Níveis codificados dos fatores estudados no DCCR experimental para as curvas de ruptura de CA em coluna de leito fixo de LDH<sub>ME</sub> e seus valores reais.

Parâmetro	- 1,41	- 1	0	+ 1	+ 1,41
Q (mL/min)	0,19	0,28	0,50	0,72	0,82
L (cm)	3,0	3,6	5,0	6,4	7,0

### 6.2.5 MODELAGEM MATEMÁTICA

O desenvolvimento do modelo matemático para adsorção de CA em leito fixo de LDH<sub>ME</sub> foi desenvolvido considerando as seguintes hipóteses: i) a coluna apresenta um empacotamento homogêneo; ii) antes de entrar no leito, bem como na saída dele, o fluxo é puramente convectivo e a porosidade é igual a 1; iii) o comportamento hidrodinâmico da fase fluida pode ser descrito pelo modelo de dispersão axial; iv) as propriedades reológicas na fase líquida foram consideradas constantes para todos os experimentos, independentemente da concentração de CA; v) a velocidade superficial é constante.

Considerando a difusão intraparticular, a variação da concentração na fase líquida fora da partícula corresponde à taxa de difusão para o interior da partícula em  $r = R_p$ . O balanço diferencial em um elemento de volume da coluna para a concentração de CA pode ser expressa por:

$$\frac{\partial C}{\partial t} = D_{ax} \frac{\partial^2 C}{\partial z^2} - v_z \frac{\partial C}{\partial z} - \left( \frac{1 - \varepsilon_B}{\varepsilon_B} \right) R_B \quad (6.7a)$$

$$R_B = \frac{(S+1) \varepsilon_p D_{ef}}{R_p} \frac{\partial C_p}{\partial r} \Big|_{r=R_p} \quad (6.7b)$$

onde C é a concentração de CA na fase líquida (mg/L), S o parâmetro geométrico (S = 2 para geometria esférica),  $D_{ax}$  o coeficiente de dispersão axial (cm<sup>2</sup>/min),  $v_z$  a velocidade superficial (cm/min),  $\varepsilon_B$  a porosidade do leito e  $R_B$  é a taxa *bulk* de variação da concentração (mg/g.min). As condições de contorno para a equação 6.7a são as seguintes:

$$t = 0 \rightarrow C(z,0) = 0 \quad (6.8)$$

$$z = 0 \rightarrow C = C_0 + \frac{D_{ax} \varepsilon_B}{v_z} \frac{\partial C}{\partial z} \quad (6.9)$$

$$z = L \rightarrow \frac{\partial C}{\partial z} = 0 \quad (6.10)$$

O balanço diferencial de massa na partícula considera os efeitos relacionados à transferência de massa na fase fluida no interior das partículas e a cinética de adsorção (onde ocorre a transferência de adsorbato da fase fluida no interior da partícula para a superfície do adsorvente, fase sólida). Esse modelo não levou em consideração a transferência de massa externa (na camada limite externa à partícula), já que em estimativas preliminares o respectivo coeficiente apresentou valores relativamente altos, ou seja, o processo é controlado principalmente pela transferência de massa interna. Além disso, as seguintes hipóteses foram consideradas: i) as partículas foram consideradas com formato esférico com raio  $R_p$ ; ii) os efeitos associados à difusão superficial do adsorbato na fase sólida assim como fenômenos de migração do adsorbato para o interior da matriz sólida

(absorção) não foram considerados; iii) na partícula ocorre fluxo de material somente na direção  $r$ , perpendicular à área  $A_r$ , e no interior da mesma o fluxo de material é predominantemente difusivo; iv) a cinética de adsorção da fase fluida para a fase sólida do adsorvente segue o modelo de pseudoprimeira ordem; v) a adsorção tem caráter isotérmico e o equilíbrio pode ser descrito pelo modelo de Langmuir:

$$q^* = \frac{q_m C^*}{k_d + C^*} \quad (6.11)$$

onde  $q^*$  é a quantidade de CA adsorvida no equilíbrio (mg/g),  $q_m$  a capacidade máxima de adsorção na monocamada (mg/g),  $k_d$  a constante de dessorção (mg/L) e  $C^*$  é a concentração de CA em solução no equilíbrio (mg/L). A isoterma de Langmuir foi a que apresentou ajustes mais satisfatórios em relação aos dados experimentais, indicando que a microencapsulação em géis de alginato proporcionou um caráter mais homogêneo ao adsorvente, já que esta isoterma está associada à formação da monocamada na superfície da partícula.

O balanço na fase sólida foi descrito pela equação 6.12, com as respectivas condições de contorno expressas nas equações 6.14 e 6.15:

$$\frac{\partial C_p}{\partial t} = \frac{D_{ef}}{r^s} \frac{\partial}{\partial r} \left( r^s \frac{\partial C_p}{\partial r} \right) - \frac{(1 - \varepsilon_p)}{\varepsilon_p} \rho_s \frac{\partial q}{\partial t} \quad (6.12)$$

$$\frac{\partial q}{\partial t} = k_{cin} (q^* - q) \quad (6.13)$$

$$r = 0 \rightarrow \frac{\partial C_p}{\partial r} = 0 \quad (6.14)$$

$$r = R_p \rightarrow C_p = C \quad (6.15)$$

onde  $C_p$  é a concentração de CA na fase líquida e no interior da partícula (mg/L),  $D_{ef}$  a difusividade efetiva ( $\text{cm}^2/\text{min}$ ),  $S$  o parâmetro geométrico ( $S = 2$  para geometria esférica),  $\rho_s$  a densidade do sólido que compõe as partículas ( $\text{g}_{\text{sólido}}/\text{cm}^3_{\text{sólido}}$ ),  $\rho_{\text{bulk}}$  a densidade aparente das partículas ( $\text{g}_{\text{sólido}}/\text{cm}^3_{\text{partículas}}$ ),  $\varepsilon_p$  a porosidade da partícula,  $k_{\text{cin}}$  a constante cinética de adsorção ( $\text{min}^{-1}$ ) e  $R_p$  o raio da partícula (cm).

As equações diferenciais apresentadas nas equações 6.7a e 6.12 foram numericamente resolvidas usando discretização pelo método das diferenças finitas. O balanço diferencial na fase sólida da equação 6.12 foi discretizado em relação ao raio da partícula e a equação 6.7a foi discretizada em relação ao comprimento do leito. Após a discretização, o sistema de equações diferenciais ordinárias foi numericamente resolvido por meio da rotina DASSL (Petzold, 1989). Todo o algoritmo foi desenvolvido em linguagem computacional FORTRAN 90.

Os parâmetros dos modelos, dispersão axial ( $D_{ax}$ ), capacidade máxima de adsorção ( $q_m$ ), constante de dessorção ( $k_d$ ) e constante cinética de adsorção ( $k_{\text{cin}}$ ) foram estimados usando o método heurístico *particle swarm optimization* (PSO). A versão do algoritmo PSO utilizada baseou-se no estudo de Schwaab et al., o qual descreve detalhadamente o algoritmo (Schwaab et al., 2008). Os intervalos de busca dos parâmetros basearam-se em estudos prévios (Barboza et al., 2003; Forte et al., 2012):  $D_{ax} \in [1 \times 10^{-5}; 1]$ ,  $q_m \in [1; 1,5 \times 10^3]$ ,  $k_d \in [1 \times 10^{-1}; 1 \times 10^5]$  e  $k_{\text{cin}} \in [1 \times 10^{-5}; 1 \times 10^1]$ . Quinze partículas foram usadas para o algoritmo PSO (esse número de partículas foi suficiente para obtenção de um bom ajuste), o peso inercial, parâmetros de reconhecimento e parâmetros sociais foram considerados 0,75; 1,5 e 1,5; respectivamente, os quais foram determinados com base na literatura (Schwaab et al., 2008; Burkert et al., 2011). A otimização foi feita minimizando a função objetiva descrita na equação 6.16, que se baseia na soma dos mínimos

quadrados (SSR), sendo  $Y$  o vetor das curvas de ruptura experimentais e  $Y^{calc}$  o vetor calculado pelo modelo:

$$SSR = \sum_1^N (Y_i - Y_i^{calc})^2 \quad (6.16)$$

A estimação dos parâmetros foi feita usando as curvas de ruptura experimentais correspondentes aos pontos fatoriais e axiais (ensaios de 1 a 8) do DCCR experimental descrito no item 6.2.4, com concentrações de alimentação fixas ( $C_0 = 2500$  mg/L) e com diferentes vazões (de 0,19 a 0,82 mL/min) e alturas de leito (de 3,0 a 7,0 cm). Os pontos centrais da matriz (0,50 mL/min e 5,0 cm) foram usados para validação do modelo.

### 6.2.6 APLICAÇÃO DO MODELO

A aplicabilidade do modelo previamente validado foi feita através de simulações usando diferentes vazões (Q) e alturas de leito (L) com o objetivo de otimizar o processo em relação às repostas  $t_b$ ,  $t_e$ ,  $\phi_{rec}$ ,  $\phi_{col}$  e P. Para isso, foi utilizada a técnica de planejamento fatorial através de um delineamento composto central rotacional (DCCR) nos níveis apresentados na Tabela 6.3.

**Tabela 6.3:** Níveis codificados dos fatores estudados no DCCR simulado e os respectivos valores usados nas simulações com os parâmetros do modelo ajustados.

Parâmetro	- 1,41	- 1	0	+ 1	+ 1,41
Q (mL/min)	0,80	0,90	1,15	1,40	1,50
L (cm)	7,0	7,4	8,5	9,6	10,0

## 6.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 6.3.1 CURVAS DE RUPTURA EXPERIMENTAIS

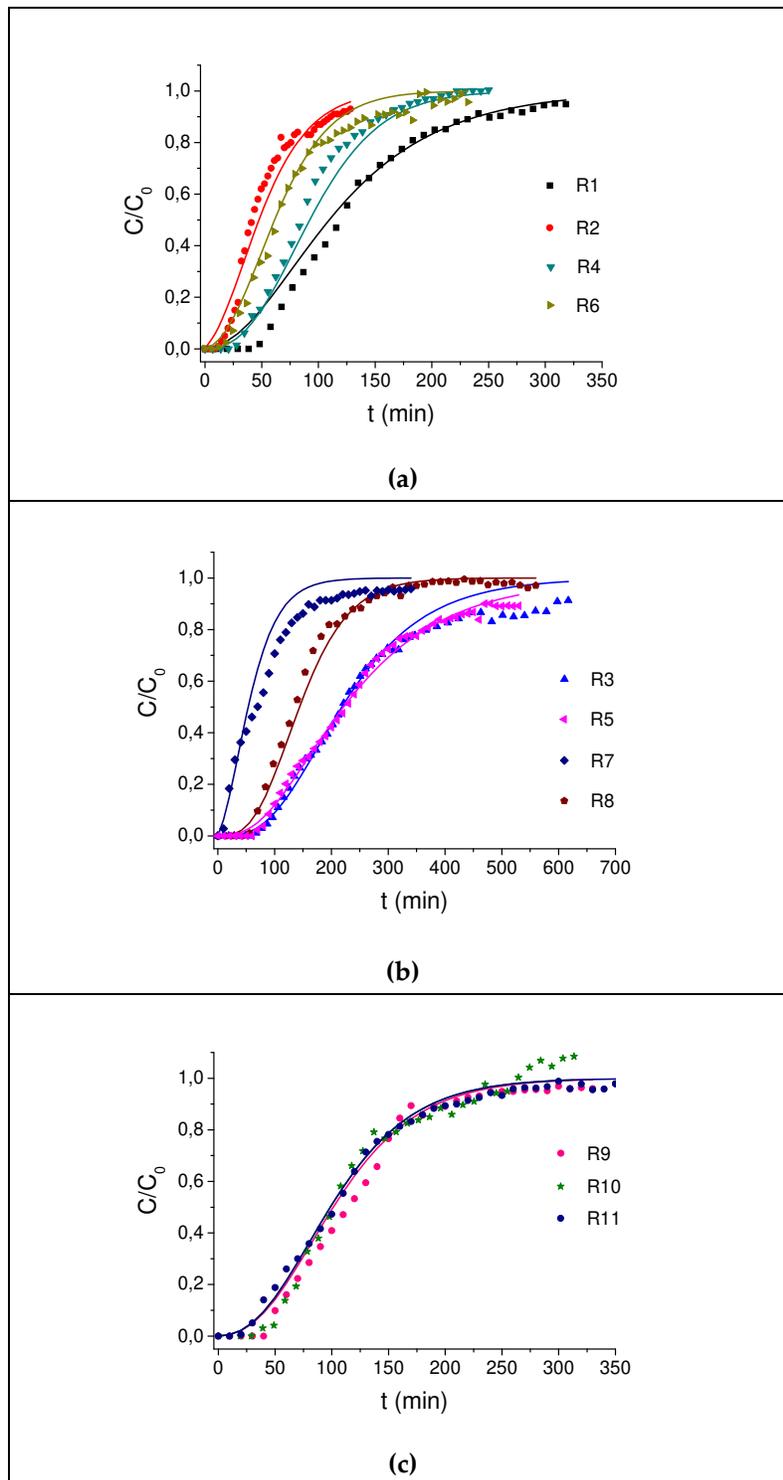
Na Tabela 6.4 estão apresentados os resultados referentes aos dados experimentais das curvas de ruptura de CA em leito fixo de LDH<sub>ME</sub>, as quais estão ilustradas na Figura 6.1. É importante a verificação dos tempos simultaneamente às eficiências e produtividades, já que é possível que haja tendências contrárias quanto ao favorecimento do processo. Em termos gerais, podemos considerar que os fatores estudados têm impacto nas respostas avaliadas tendo em vista que houve uma boa variação nos valores calculados. De fato, vazão e altura de leito estão entre as variáveis mais importantes em curvas de ruptura (Luz et al., 2008; Burkert et al., 2011). No entanto, praticamente não houve variação na eficiência de recuperação a qual foi em torno de 98 %, demonstrando uma boa recuperação de CA.

Em relação e eficiência da coluna, a mesma variou de 16,0 a 62,0 %, porém em condições experimentais relativamente similares. Um comportamento semelhante foi observado por Burkert em curvas de ruptura de cefalosporina C em colunas de leito fixo com a resina XAD-2 (Burkert, 1998), observando que a eficiência da coluna foi mais influenciada pela altura do leito. A eficiência da coluna está diretamente relacionada com o tempo de contato do soluto com o adsorvente, quanto menor a vazão maior é o tempo de contato. Por outro lado, o tempo de contato também está estritamente relacionado com a altura do leito (Burkert et al., 2011). Isso é um exemplo de como, principalmente nesse caso, as variáveis do processo devem ser avaliadas de forma simultânea.

Os tempos de ruptura e de exaustão variaram, respectivamente de 14,7 a 103,7 min e de 111,0 a 593,0 min. Como era de se esperar, as maiores produtividades estão associadas aos menores tempos observados, esses valores ficaram entre 14,8 e 55,1 kg/h.

**Tabela 6.4:** Dados do delineamento (DCCR) experimental para as curvas de ruptura de ácido clavulânico em leito fixo de LDH<sub>ME</sub>: tempo de ruptura ( $t_b$ ), tempo de exaustão ( $t_e$ ), eficiência de recuperação ( $\phi_{rec}$ ), eficiência de utilização da coluna ( $\phi_{col}$ ) e produtividade (P) em função da vazão (Q) e comprimento do leito (L).

Ensaio	Q (mL/min)	L (cm)	$t_b$ (min)	$t_e$ (min)	$\phi_{rec}$ (%)	$\phi_{col}$ (%)	P (kg/h)
R1	-1 (0,28)	-1 (3,6)	60,3	236,3	98,7	48,9	21,6
R2	1 (0,72)	-1 (3,6)	22,3	111,0	97,8	61,9	32,8
R3	-1 (0,28)	1 (6,4)	103,7	593,0	98,3	39,5	17,6
R4	1 (0,72)	1 (6,4)	38,7	156,0	98,4	44,6	53,0
R5	-1,41 (0,19)	0 (5,0)	95,0	470,0	98,4	38,5	14,8
R6	1,41 (0,82)	0 (5,0)	27,0	150,9	97,4	37,5	55,1
R7	0 (0,50)	-1,41 (3,0)	14,7	175,0	96,6	16,0	35,9
R8	0 (0,50)	1,41 (7,0)	70,0	261,3	98,9	49,7	39,0
R9	0 (0,50)	0 (5,0)	50,0	205,0	97,4	36,0	40,0
R10	0 (0,50)	0 (5,0)	54,0	215,6	98,4	48,3	35,2
R11	0 (0,50)	0 (5,0)	35,6	210,0	97,8	32,6	35,3



**Figura 6.1:** Curvas de ruptura do delineamento (DCCR) experimental: os pontos correspondem aos dados experimentais e as linhas contínuas aos calculados pelo modelo matemático ajustado pelo algoritmo (PSO).

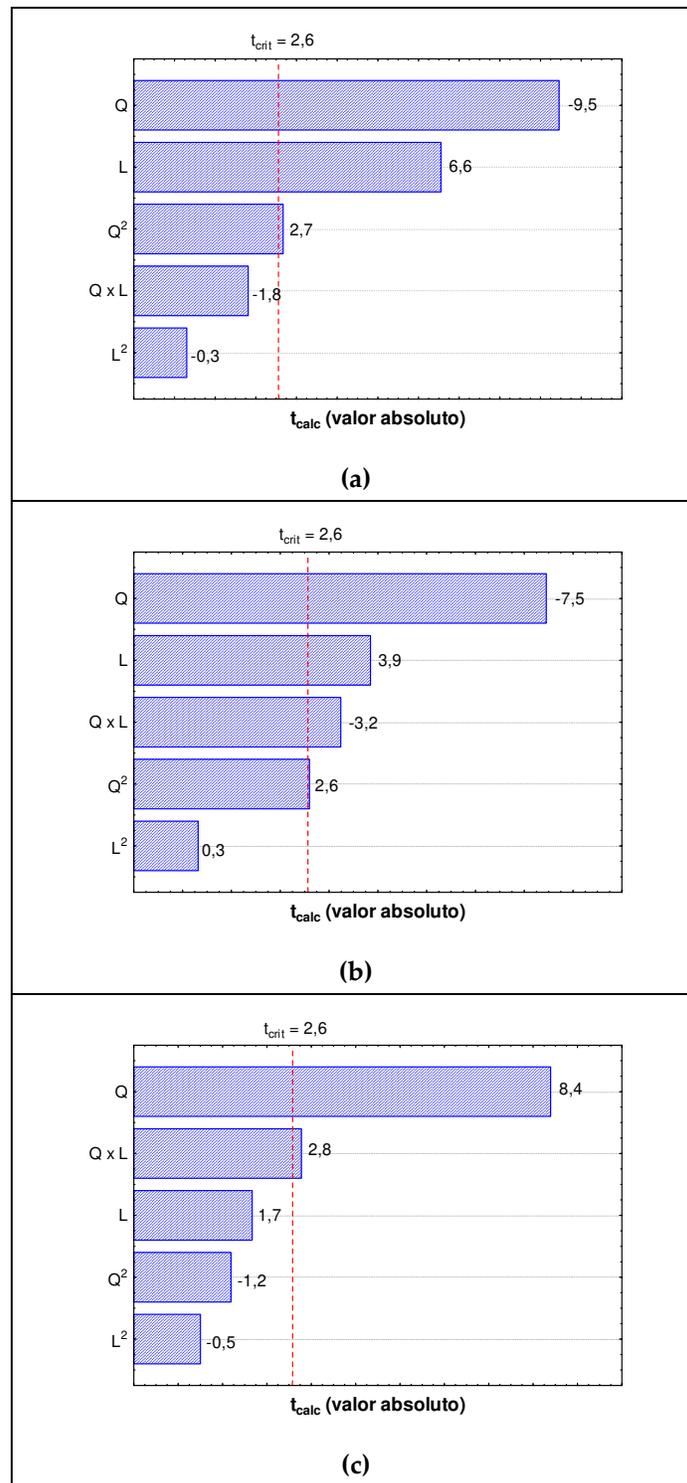
Os efeitos dos parâmetros operacionais foram avaliados através dos gráficos de Pareto na Figura 6.2, onde são mostrados apenas os resultados para as repostas que foram influenciadas estatisticamente, a um nível de significância de 5 %. Após análise dos efeitos e devidas reparametrizações, as equações empíricas de  $t_b$ ,  $t_e$  e  $P$  em função de  $Q$  e  $L$  foram obtidas e estão descritas nas equações 6.17 a 6.19:

$$t_b \text{ (min)} = 45.6 - 25.0 Q + 8.7 Q^2 + 17.3 L \quad (6.17)$$

$$t_e \text{ (min)} = 216.2 - 126.7 Q + 50.7 Q^2 + 65.5 L - 77.9 Q L \quad (6.18)$$

$$P \text{ (kg / h)} = 34.6 + 13.0 Q + 6.1 Q L \quad (6.19)$$

A análise de variância (ANOVA) foi realizada para a validação dos modelos empíricos no nível de significância adotado (5 %), os resultados podem ser visualizados na Tabela 6.5. A partir dessa tabela, podemos concluir que os modelos empíricos foram validados, já que os coeficientes de determinação foram acima de 90 % e os valores de  $F_{\text{calc}}$  foram superiores aos tabelados (Rodrigues and Lemma, 2012). Dessa forma é possível gerar as respectivas superfícies de resposta para uma avaliação do processo em função das variáveis estudadas, conforme Figura 6.3.



**Figure 6.2:** Diagramas de Pareto para as respostas avaliadas no processo de adsorção de ácido clavulânico: (a) tempo de ruptura,  $t_b$ ; (b) tempo de exaustão,  $t_e$ ; (c) produtividade, P.

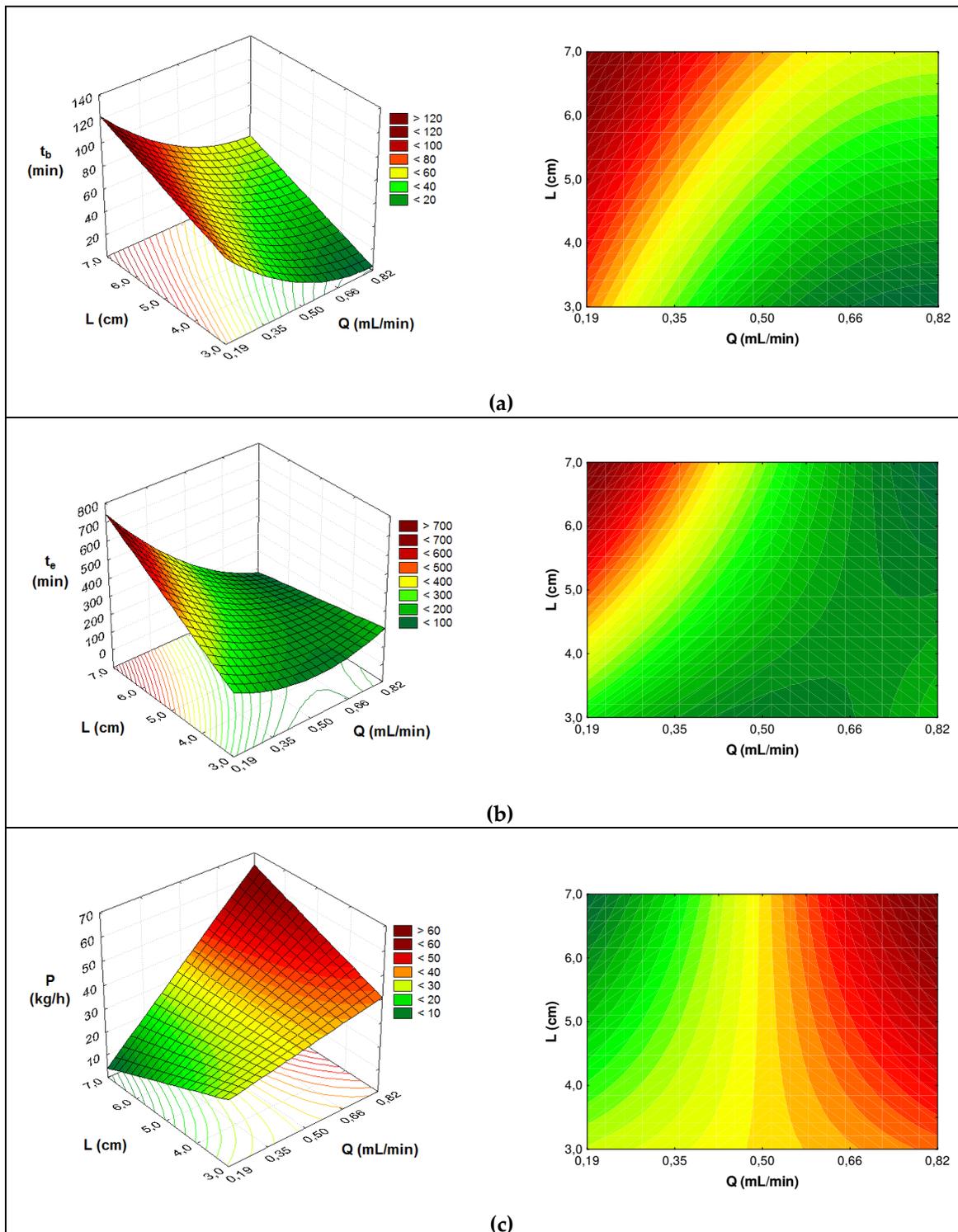
**Tabela 6.5:** ANOVA dos modelos empíricos para tempo de ruptura ( $t_b$ ), tempo de exaustão ( $t_e$ ) e produtividade (P): coeficientes de determinação ( $R^2$ ), fatores F calculados ( $F_{calc}$ ) e tabelado para 5 % de significância ( $F_{list}$ ).

Resposta	Fonte de variação	Soma de quadrados	Grau de liberdade	Quadrado médio	$F_{calc}$
$t_b$	Regressão	7802,3	3	2600,8	39,2
	Resíduos	464,7	7	66,4	
	Total	8267,0	10		
$t_e$	Regressão	202873,3	4	50718,3	25,8
	Resíduos	11796,6	6	1966,1	
	Total	214670,0	10		
P	Regressão	1492,0	2	746,0	33,9
	Resíduos	176,1	8	22,0	
	Total	1668,0	10		

$t_b$ :  $R^2 = 0,944$ ;  $F_{list}(3, 7, 5\%) = 4,35$ ;  $t_e$ :  $R^2 = 0,945$ ;  $F_{list}(4, 6, 5\%) = 4,53$ ;

P:  $R^2 = 0,894$ ;  $F_{list}(2, 8, 5\%) = 4,46$ .

É importante enfatizar que apesar de não ter sido possível analisar a eficiência da coluna através de superfícies de resposta, tendo em conta que esse parâmetro está diretamente relacionado com o tempo de contato com o adsorvente, é possível fazer um paralelo com o tempo de exaustão, ou seja, um maior aproveitamento da capacidade da coluna pode ser associado a condições que levam a um menor tempo de exaustão. No presente caso, a viabilidade do processo é dependente do compromisso entre baixos tempos de ruptura (e de exaustão) e ao mesmo tempo a altas eficiências e produtividades. Em casos como esse, a análise de superfícies de resposta é uma ferramenta útil e pode ser decisiva na escolha de melhores condições de operação para as respostas simultaneamente.



**Figura 6.3:** Superfícies de resposta e curvas de contorno para as respostas avaliadas no processo de adsorção de ácido clavulânico: (a) tempo de ruptura,  $t_b$ ; (b) tempo de exaustão,  $t_e$ ; (c) produtividade,  $P$ .

A partir da Figura 6.3, podemos observar que baixas vazões e altos comprimentos de leitos são desfavoráveis ao processo em ambos os pontos de vista. Para o tempo de ruptura, altas vazões e baixas alturas de leito são requeridas, porém baixas alturas prejudicam o processo quanto à produtividade. No entanto, através das superfícies tridimensionais, é visível a vantagem em se utilizar sistemas com aumento de ambos os parâmetros, já que o aumento da produtividade é alto ao ponto de compensar a perda (aumento) nos tempos, principalmente em relação ao tempo de exaustão. Assim, torna-se interessante a avaliação desses comportamentos utilizando-se de vazões e alturas de leito mais elevados. Por exemplo, na condição de  $Q = 0,82$  mL/min e  $L = 7,0$  cm, os valores das respostas segundo as equações empíricas (6.17 a 6.19) são  $t_b = 62$  min,  $t_e = 76$  min e  $P = 65$  kg/h, o que corresponde um aumento de 32 % em  $t_b$ , diminuição de 64 % em  $t_e$  e aumento de 76 % em  $P$ , o que pode ser considerado mais vantajoso para o processo.

### 6.3.2 ESTIMAÇÃO DOS PARÂMETROS E VALIDAÇÃO DO MODELO

Os parâmetros de transporte, de equilíbrio e cinéticos estimados e otimizados pelo algoritmo PSO, com exceção da difusividade efetiva,  $D_{ef}$ , estão listados na Tabela 6.6. As curvas de ruptura experimentais R1 a R8 (Figura 6.1a e 6.1b) foram usadas pelo algoritmo na estimação e os ensaios R9 a R10 (Figura 6.1c) foram usadas na validação do modelo. A partir desses gráficos, é possível observar que houve boa concordância entre os resultados experimentais e os calculados pelo modelo que se mostrou eficiente e robusto na predição das concentrações. O modelo validado foi posteriormente utilizado para simular condições experimentais na tentativa de otimizar o processo quanto ao tempo, eficiências e produtividades.

**Tabela 6.6:** Parâmetros de transporte, cinéticos e de equilíbrio estimados e otimizados pelo algoritmo PSO para o modelo proposto para a adsorção de ácido clavulânico.

<b>*D<sub>ef</sub> x 10<sup>4</sup></b> <b>(cm<sup>2</sup>/min)</b>	<b>D<sub>ax</sub></b> <b>(cm<sup>2</sup>/min)</b>	<b>q<sub>m</sub> x 10<sup>-3</sup></b> <b>(mg/g)</b>	<b>k<sub>d</sub></b> <b>(mg/L)</b>	<b>k<sub>cin</sub></b> <b>(min<sup>-1</sup>)</b>
3,78	0,730	0,916	22,80	0,109

\* Parâmetro estimado através de dados e correlações da literatura.

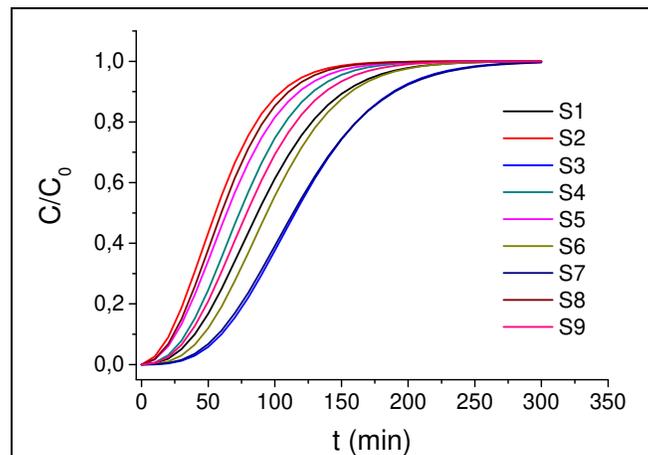
A difusividade efetiva foi estimada através de correlações entre o tamanho relativo da macromolécula ( $\lambda_{rel} = 2 R_{CA}/d_{pore}$ ) e a difusividade relativa ( $D_{ef}/D_m$ ) (Cannell and Rondelez, 1980; Baltus and Anderson, 1983; Anderson et al., 1988; Limbach and Wei, 1990; Suzuki, 1990), onde  $D_m$  é a difusividade de CA na fase líquida. No presente caso, temos os seguintes valores:  $d_{pore} = 154$  nm,  $R_{CA} = 1$  nm (Forte et al., 2013b),  $D_m = 4,2 \times 10^{-4}$  cm<sup>2</sup>/min (Cuel et al., 2011). Através das correlações, para um valor calculado de  $\lambda_{rel} = 2 R_{CA}/d_{pore} = 0,013$ , temos que a difusividade relativa,  $D_{ef}/D_m \approx 0,90$ . Logo,  $D_{ef}$  foi estimada em  $3,78 \times 10^{-4}$  cm<sup>2</sup>/min.

Os valores estimados para os parâmetros foram condizentes com a literatura. O coeficiente de dispersão axial foi  $D_{ax} = 0,730$  cm<sup>2</sup>/min. (Luz et al., 2008) determinaram experimentalmente valores de dispersão axial entre 1 e 2 cm<sup>2</sup>/min para resinas de troca iônica Dowex com 320 μm de diâmetro. (Cuel et al., 2011) encontraram uma dispersão axila de até 2,7 cm<sup>2</sup>/min na adsorção de CA em colunas de resina de troca iônica Amberlite IRA400. Os coeficientes de difusão e de transferência de massa são importantes e dependem dos diferentes sólidos, escoamento e porosidade. A difusão efetiva envolve a difusão de Knudsen e a difusão convectiva, que dependem se o fluido é gasoso ou líquido e se os poros são grandes ou pequenos. A dispersão axial é diretamente proporcional e bastante

sensível à razão entre o diâmetro do tubo e o da partícula (Schmal, 2010). Outro aspecto importante é em relação ao número de Reynolds (Re). Baixas vazões estão relacionadas a baixos valores para o Re, havendo um aumento no coeficiente de transferência de massa externo que está associado a altas dispersões axiais. Os parâmetros de equilíbrio estimados foram:  $q_m = 0,916 \times 10^3$  mg/g,  $k_d = 22,80$  mg/L. (Forte et al., 2012; Forte et al., 2013b) têm reportado altas capacidades de adsorção para adsorventes do tipo LDH. A constante de dessorção foi semelhante às observadas por outros autores em adsorções de CA usando tanto colunas como em reatores de mistura (Barboza et al., 2003; Cuel et al., 2011). As partículas de LDH<sub>ME</sub> apresentaram eficácia em relação à cinética. A constante estimada,  $k_{cin} = 0,109$  min<sup>-1</sup>, foi maior que a de outros adsorventes incluindo outros tipos de LDH (Yang et al., 2005; Sulak et al., 2007), indicando que a capacidade cinética dos cristais de LDH não é afetada pela camada de gel de alginato de cálcio.

### 6.3.3 SIMULAÇÕES E OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO

Nas seções anteriores, foi observado que o processo é favorecido pelo aumento das variáveis vazão e altura de leito. Torna-se interessante o estudo desses perfis. Porém, um grande número de experimentos, principalmente no caso onde se utilizaria grandes quantidades de adsorventes e de soluções, pode representar um gasto de tempo e material excessivos. Essa análise foi realizada usando níveis mais elevados das variáveis de entrada, porém com simulações usando o modelo desenvolvido e validado com os parâmetros estimados e otimizados pela PSO. Para isso, foi realizado um DCCR simulado cujos níveis foram apresentados na Tabela 6.3. As respectivas curvas de ruptura estão ilustradas na Figura 6.4.



**Figura 6.4:** Curvas de ruptura simuladas usando o modelo proposto com os parâmetros estimados para a adsorção de ácido clavulânico.

Os resultados das simulações são apresentados na Tabela 6.7. Não foi possível ajustar um modelo empírico a partir dessa matriz, no entanto, os resultados foram considerados satisfatórios. A partir da análise desses resultados, é possível verificar que o processo foi favorecido. Houve diminuição nos tempos de ruptura e de exaustão e aumento significativo nas produtividades. Apesar do tempo de ruptura mínimo dos ensaios ( $t_b = 21,0$  min) ter sido um pouco mais alto que o do DCCR anterior ( $t_b = 14,7$  min), é evidente que de uma forma geral esses tempos foram menores. O resultado foi semelhante em relação ao tempo de exaustão, os quais ficaram entre 100 e 190 min. As eficiências de recuperação continuaram com valores em torno de 97 %, mostrando que as modificações na altura do leito não comprometeram a qualidade de recuperação do CA.

**Tabela 6.7:** Dados do delineamento (DCCR) simulado para as curvas de ruptura de ácido clavulânico em leito fixo de LDH<sub>ME</sub>: tempo de ruptura ( $t_b$ ), tempo de exaustão ( $t_e$ ), eficiência de recuperação ( $\phi_{rec}$ ), eficiência de utilização da coluna ( $\phi_{col}$ ) e produtividade (P) em função da vazão de alimentação (Q) e comprimento do leito (L).

Ensaio	Q (mL/min)	L (cm)	$t_b$ (min)	$t_e$ (min)	$\phi_{rec}$ (%)	$\phi_{col}$ (%)	P (kg/h)
S1	-1 (0,90)	-1 (7,4)	39,9	152,7	97,0	42,1	74,8
S2	1 (1,40)	-1 (7,4)	21,0	105,1	96,2	35,0	106,1
S3	-1 (0,90)	1 (9,6)	60,0	188,9	97,5	50,2	76,6
S4	1 (1,40)	1 (9,6)	32,9	128,8	97,0	42,9	111,6
S5	-1,41 (0,80)	0 (8,5)	25,5	118,3	96,5	36,9	89,2
S6	1,41 (1,50)	0 (8,5)	46,3	157,4	97,2	46,7	97,1
S7	0 (1,15)	-1,41 (7,0)	57,3	190,0	97,4	48,0	67,6
S8	0 (1,15)	1,41 (10,0)	23,9	110,3	96,2	36,9	116,9
S9	0 (1,15)	0 (8,5)	35,6	138,0	96,9	42,6	93,3

Apesar dos valores das eficiências da coluna continuarem praticamente no mesmo patamar, foi observado que os resultados se mostraram mais homogêneos em função das diferentes vazões e tamanhos de leito, com um máximo em 50 % e um mínimo em 35 %. Como comentado anteriormente, essa resposta está associada ao tempo de contato das moléculas de CA com as partículas do adsorvente LDH<sub>ME</sub>. Nas simulações para otimização do sistema, os dois parâmetros foram variados simultaneamente de forma que esse tempo de contato não foi variado de forma mais acentuada. Em condições de maiores vazões com menores alturas de leito,

certamente os resultados mostrariam um melhor aproveitamento da coluna. Entretanto, o ganho com a produtividade com o uso dessas condições foi considerado satisfatório. A otimização da produtividade é o aspecto mais importante quando se processa produtos de alto valor agregado, como é o caso do CA. As produtividades foram dobradas, passando de patamares de até 50 kg/h, nas condições anteriores, para até 117 kg/h. As melhores condições para utilização do processo de adsorção de CA estudado foram as do ensaio 8 ( $Q = 1,15$  mL/min e  $L = 10,0$  cm), com os melhores resultados tempo de operação, eficiências e produtividades ( $t_b = 24$  min,  $t_e = 110$  min,  $\phi_{rec} = 96$  %,  $\phi_{col} = 37$  % e  $P = 117$  kg/h).

#### 6.4 CONCLUSÕES

O processo de adsorção de CA em partículas de LDH<sub>ME</sub> foi avaliado através da obtenção de curvas de ruptura experimentais. O modelo matemático proposto foi capaz de prever o comportamento das curvas de ruptura, sendo o processo considerado como controlado pela etapa de transferência de massa interna e cineticamente descrito pelo modelo de pseudoprimeira ordem. O algoritmo de estimação de parâmetros PSO se mostrou uma ferramenta eficaz em processos de adsorção. Os parâmetros estimados foram:  $D_{ef} = 3,78 \times 10^{-4}$  cm<sup>2</sup>/min,  $D_{ax} = 0,730$  cm<sup>2</sup>/min,  $q_m = 0,916 \times 10^3$  mg/g,  $k_d = 22,80$  mg/L e  $k_{cin} = 0,109$  min<sup>-1</sup>. A modelagem matemática confirmou ser uma técnica útil tanto na determinação de parâmetros importantes do processo como na simulação de sistemas em escalas maiores ou em condições operacionais mais favoráveis, podendo ser aplicável em processos industriais com economia de tempo e de material.

## 6.5 AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Laboratório de Microestrutura de Alimentos (DEPAN/FEA/UNICAMP), Laboratório de Engenharia de Processos (DEA/FEA/UNICAMP) e ao Laboratório de Engenharia Ambiental (DDPP/FEQ/UNICAMP) pela disponibilidade dos equipamentos para fabricação e caracterização das micropartículas. Esta pesquisa foi financiada pela FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) – processo n° 2008/57298-3 e pela CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) – processo n° BEX 6843/10-7.

## 6.6 REFERÊNCIAS

- ANDERSON, J. L.; KATHAWALLA, I. A.; LINDSEY, J. S. Configurational effects on hindered diffusion in micropores. **AIChE Symposium Series, Diffusion and Convection in Porous Catalysts**, v. 84, p. 35-39, 1988.
- BALTUS, R. E. and ANDERSON, J. L. Hindered diffusion of asphaltenes through microporous membranes. **Chem Eng Sci**, v. 38, p. 1959-1969, 1983.
- 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. **Biochem Eng J**, v. 14, p. 19-26, 2003.
- BELTER, P. A.; CUSSLER, E. L.; HU, W.-S. **Bioseparations: downstream processing for biotechnology**. New York: Wiley-Interscience, 1988.
- BIRD, A. E.; BELLIS, J. M.; GASSON, B. C. Spectrophotometric Assay of Clavulanic Acid by Reaction with Imidazole. **Analyst**, v. 107, p. 1241-1245, 1982.
- BURKERT, C. A. V. **Estudo experimental e teórico da separação de cefalosporina C em coluna de leito fixo**. Thesis: M.Sc. 67 p. University of Campinas, Campinas-SP, 1998.
- BURKERT, C. A. V.; BARBOSA, G. N. O.; MAZUTTI, M. A.; MAUGERI, F. Mathematical modeling and experimental breakthrough curves of cephalosporin C adsorption in a fixed-bed column. **Process Biochem**, v. 46, p. 1270-1277, 2011.

- CANNELL, D. S. and RONDELEZ, F. Diffusion of polystyrenes through microporous membranes. **Macromolecules**, v. 13, p. 1599-1602, 1980.
- CUEL, M.; BARBOZA, M.; HOKKA, C.; KWONG, W. Heterogeneous Model of the Process of Clavulanic Acid Purification by Ionic Exchange in a Fixed-Bed Column. **Chemical Product and Process Modeling**, v. 6, p. article 1: 1-18, 2011.
- FORTE, M. B. S.; ELIAS, E. C. L.; PASTORE, H. O.; MAUGERI, F.; RODRIGUES, M. I. Evaluation of Clavulanic Acid Adsorption in MgAl-layered Double Hydroxides: Kinetic, Equilibrium and Thermodynamic Studies. **Adsorpt Sci Technol**, v. 30, p. 65-80, 2012.
- FORTE, M. B. S.; RODRIGUES, M. I.; MAUGERI FILHO, F. Clavulanic acid adsorption studies in zeolites. **Adsorpt. Sci. Technol.**, v. 29, p. 391-404, 2011.
- FORTE, M. B. S.; TAVIOT-GUÉHO, C.; LEROUX, F.; RODRIGUES, M. I.; MAUGERI FILHO, F. Desenvolvimento e caracterização de micropartículas de alginato com hidróxidos duplos lamelares encapsulados e sua aplicação como adsorventes em coluna de leito fixo para separação de ácido clavulânico. **Cap. 5 desta Tese**, v. . p. . 2013a.
- FORTE, M. B. S.; TAVIOT-GUÉHO, C.; LEROUX, F.; RODRIGUES, M. I.; MAUGERI FILHO, F. Intercalation and adsorption of clavulanic acid in layered double hydroxides. **Food Bioprod. Process.**, v. Cap. 4 desta Tese (In review), p. . 2013b.
- KUHN, R. C. and MAUGERI, F. Purification of fructooligosaccharides in an activated charcoal fixed bed column. **New Biotechnol**, v. 27, p. 862-869, 2010.
- LIMBACH, K. W. and WEI, J. Restricted diffusion through granular materials. **AIChE Journal**, v. 36, p. 242-248, 1990.
- LUZ, D. A.; RODRIGUES, A. K. O.; SILVA, F. R. C.; TORRES, A. E. B.; CAVALCANTE, C. L.; BRITO, E. S.; AZEVEDO, D. C. S. Adsorptive separation of fructose and glucose from an agroindustrial waste of cashew industry. **Bioresource Technol**, v. 99, p. 2455-2465, 2008.
- MORAES, C. C.; MAZUTTI, M. A.; RODRIGUES, M. I.; MAUGERI, F.; KALIL, S. J. Mathematical modeling and simulation of inulinase adsorption in expanded bed column. **J Chromatogr A**, v. 1216, p. 4395-4401, 2009.

- PETZOLD, I. R. Computing and mathematics research DASSL Code. version 1989 division, Lawrence Livermore National Laboratory, L316, PO Box 808, Livermore, CA 94559, 1989.
- RODRIGUES, M. I. and IEMMA, A. F. **Experimental Design and Process Optimization**. Campinas: Cárita, 2012.
- SAUDAGAR, P. S.; SURVASE, S. A.; SINGHAL, R. S. Clavulanic acid: A review. **Biotechnol Adv**, v. 26, p. 335-351, 2008.
- SCHMAL, M. **Cinética e Reatores**. Rio de Janeiro: Synergia, 2010.
- SCHWAAB, M.; BISCAIA, E. C.; MONTEIRO, J. L.; PINTO, J. C. Nonlinear parameter estimation through particle swarm optimization. **Chem Eng Sci**, v. 63, p. 1542-1552, 2008.
- SILVA, C. S.; CUEL, M. F.; BARRETO, V. O.; KWONG, W. H.; HOKKA, C. O.; BARBOZA, M. Separation of clavulanic acid from fermented broth of amino acids by an aqueous two-phase system and ion-exchange adsorption. **New Biotechnol**, v. 29, p. 428-431, 2012.
- SULAK, M. T.; DEMIRBAS, E.; KOBYA, M. Removal of Astrazon Yellow 7GL from aqueous solutions by adsorption onto wheat bran. **Bioresour Technol**, v. 98, p. 2590-2598, 2007.
- SUZUKI, M. **Adsorption Engineering**. Tokyo: Kodansha, Elsevier, 1990.
- YANG, L.; SHAHRIVARI, Z.; LIU, P. K. T.; SAHIMI, M.; TSOTSIS, T. T. Removal of Trace Levels of Arsenic and Selenium from Aqueous Solutions by Calcined and Uncalcined Layered Double Hydroxides (LDH). **Ind. Eng. Chem. Res.**, v. 44, p. 6804-6815, 2005.



# **CAPÍTULO 7**

**Conclusões gerais e sugestões para trabalhos futuros**



## 7.1 CONCLUSÕES GERAIS

Esse trabalho verificou a adsorção de ácido clavulânico (CA) em diversos tipos de adsorventes do tipo hidróxidos duplos lamelares (LDH). Todos eles demonstraram boa capacidade de adsorção em relação a essa molécula.

Em um primeiro momento, foram avaliados LDH do tipo hidrotalcitas [Mg-Al-CO<sub>3</sub>] com diferentes composições (30, 63 e 70 % de MgO) não calcinadas e calcinadas. Das hidrotalcitas estudadas [Mg-Al-CO<sub>3</sub>], a que se apresentou como melhor opção foi a HT70c pois, juntamente com a HT63c, demonstrou um perfil cinético de adsorção mais favorável, porém com aumentos menores no pH. O processo de adsorção de CA em hidrotalcitas apresentou caráter endotérmico, espontâneo a temperaturas ambientes e controlado pela transferência de massa externa e demonstraram bom potencial como adsorventes para separação de CA. O modelo proposto e ajustado aos dados experimentais de adsorção em batelada se mostrou mais sensível ao coeficiente de transferência de massa externo, através de estudo de sensibilidade paramétrica.

Foram descobertas fases de LDH mais adequadas que as estudadas anteriormente. Novos adsorventes foram sintetizados e caracterizados, garantindo um maior grau de pureza dos adsorventes, os quais apresentarem maiores capacidades. O sistema Zn<sub>2</sub>Cr-Cl foi usado na intercalação do CA nos espaços interlamelares, a qual foi realizada para verificação e avaliação da afinidade entre a molécula do CA e os espaços interlamelares dos LDH. Essa afinidade pode ser confirmada através de técnicas analíticas, o que garantiu o avanço da pesquisa. Os LDH Zn<sub>2</sub>Cr-NO<sub>3</sub>, Zn<sub>2</sub>Al-NO<sub>3</sub> e Mg<sub>2</sub>Al-NO<sub>3</sub> foram avaliados quanto à adsorção de CA através de isotermas de adsorção. O LDH selecionado para continuidade do projeto foi o Zn<sub>2</sub>Cr-NO<sub>3</sub>. Grandes quantidades desse adsorvente foram

sintetizadas. Estudos de equilíbrio foram realizados e um caráter endotérmico também foi constatado para os LDH sintetizados.

A técnica de microencapsulação apresentou bons resultados e apresenta-se como uma boa alternativa para imobilização de materiais sólidos, mais especificamente, adsorvente do tipo LDH. As esferas formadas demonstraram boa estabilidade e uniformidade quanto às propriedades das partículas. Os adsorventes encapsulados apresentaram altas capacidades de adsorção mostrando que a camada de gel da cápsula não interferiu no desempenho dos adsorventes.

Os LDH se mostraram seletivos em relação ao CA na presença de contaminantes (aminoácidos), bons fatores de purificação foram alcançados, sugerindo um campo a ser explorado na área de separação tanto do CA como também de outras biomoléculas. No entanto, melhores condições operacionais no tocante principalmente a recuperação precisam ser investigadas.

Fica evidente também a utilidade de ferramentas como planejamento experimental, modelagem matemática e simulação de processos e, em alguns casos, a união entre elas. Com planejamento fatorial foi possível estimar coeficientes de hidrólise, realizar análise de sensibilidade paramétrica em modelos ajustados, otimizar processos além de auxiliar na simulação de sistemas. Com a modelagem matemática foi possível ajustar parâmetros os quais são indispensáveis no conhecimento do processo e para etapa de *scale-up*.

## 7.2 SUGESTÕES

- Estudar técnicas para descobrir substâncias que aumentem a estabilidade do CA, já que esse é o principal problema nos estudos separação e purificação, em especial, adsorção;
- Avaliar outras condições para microencapsulação, tais como proporção de sólidos e concentrações do biopolímero tal como da solução salina;
- Verificar outras condições operacionais na coluna (temperatura, vazão, volume de pulso, etc.) em adsorções usando pulso cromatográfico e curvas de ruptura;
- Explorar mais o modelo matemático desenvolvido. O programa desenvolvido pode resolver curvas de ruptura com diferentes modelos (com e sem cinética, com e sem difusão intraparticular, com e sem efeito de película);
- Usar outras fases móveis, como etanol e outros solventes orgânicos. Tanto a estabilidade da molécula do CA como da estrutura dos microgéis são favorecidos pela presença de soluções alcoólicas.