UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS LABORATÓRIO DE ENGENHARIA DE BIOPROCESSOS

PURIFICAÇÃO DE ÁCIDO CLAVULÂNICO UTILIZANDO ZEÓLITAS

Autor: Marcus Bruno Soares Forte

Engenheiro de Alimentos, UFPB, 2006.

Orientadora: Prof^a Dr^a Maria Isabel Rodrigues

Co-orientador: Prof. Dr. Francisco Maugeri Filho

Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Mestre em Engenharia de Alimentos.

CAMPINAS – SP Março de 2008

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DA FEA – UNICAMP

 Forte, Marcus Bruno Soares F776p Purificação de ácido clavulânico utilizando zeólitas / Marcus Bru Soares Forte Campinas, SP: [s.n.], 2008. Orientador: Maria Isabel Rodrigues Co-orientador: Francisco Maugeri Filho 		
Orientador: Maria Isabel Rodrigues Co-orientador: Francisco Maugeri Filho	F776p	Forte, Marcus Bruno Soares Purificação de ácido clavulânico utilizando zeólitas / Marcus Bruno Soares Forte Campinas, SP: [s.n.], 2008.
Faculdade de Engenharia de Alimentos		Orientador: Maria Isabel Rodrigues Co-orientador: Francisco Maugeri Filho Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos
 Ácido clavulânico. Zeólitos. Purificação. Leito fixo. Rodrigues, Maria Isabel. Maugeri Filho, Francisco. Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos. IV. Título. 		 Ácido clavulânico. Zeólitos. Purificação. Leito fixo. Rodrigues, Maria Isabel. Maugeri Filho, Francisco. Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos. IV. Título.
(cars/fea)		(cars/fea)

Titulo em inglês: Purification of clavulanic acid using zeolites Palavras-chave em inglês (Keywords): Clavulanic acid, Zeolites, Purification, Fixed bed Titulação: Mestre em Engenharia de Alimentos Banca examinadora: Maria Isabel Rodrigues Daniel Ibraim Pires Atala Marlei Barboza Pasotto Fernando Antonio Cabral Programa de Pós Graduação: Programa em Engenharia de Alimentos

BANCA EXAMINADORA

Prof^a Dr^a Maria Isabel Rodrigues Orientadora (DEA/FEA/UNICAMP)

Prof. Dr. Fernando Antonio Cabral Membro (DEA/FEA/UNICAMP)

Prof. Dr. Marlei Barboza Pasotto Membro (DEQ/UFSCar)

Dr. Daniel Ibraim Pires Atala Membro (Centro de Tecnologia Canavieira/Piracicaba-SP)

Amo aquele que sonha com o impossível.

Johann Wolfgang von Goethe

Não tente ser bem sucedido, tenta antes ser um homem de valor. Albert Einstein

A meus pais, Sebastião de Sousa Forte e Guiomar Soares Maia Forte (in memoriam).

A meus avós, Bento de Sousa Forte (in memoriam) e Antonia Maria de Lima.

AGRADECIMENTOS

A DEUS, por me dar a oportunidade de crescer como pessoa e profissional ao mesmo tempo em que retribuo de alguma forma o investimento em mim depositado pela sociedade;

Aos professores e funcionários da Faculdade de Engenharia de Alimentos, em especial, do Departamento de Engenharia de Alimentos e Secretaria de Pós-graduação;

À FAPESP e CNPq pelo suporte financeiro;

Aos meus queridos orientadores, Maria Isabel Rodrigues e Francisco Maugeri Filho, por tudo que fizeram por mim, pela partilha de conhecimento, paciência, compreensão e pelo exemplo de profissionalismo e compaixão;

Aos componentes da Banca Examinadora pela contribuição e auxílio;

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;

Ao Prof. Mansur do Laboratório de Análises Térmicas/UFSCar, Prof. Moran do Departamento de Química Orgânica/IQ/UNICAMP e ao Laboratório Nacional de Luz Síncrotron, pelo suporte em análises;

A minha mãe, Guiomar, pela presença espiritual constante, sem a qual, tenho certeza que nada disso seria possível. A meu pai, Sebastião, pelo exemplo de ética, caráter, dedicação, honestidade, enfim, o meu referencial. A meus irmãos, Delano e Márlon, pelo apoio incondicional em diferentes etapas de minha vida, vocês são o meu porto seguro......

A toda minha família, amo todos vocês. A meus tios, Josemar e Marina, e meus primos, Allysson, Déllio e Simone, pelo carinho e compreensão em uma fase importante de minha vida;

A Cidora, Thallyssa, Thallytta, Helber e meus compadres, Júnior e Silvaneide, pelo carinho, amizade e diversão em todos os momentos;

vi

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;

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;

As amigas, Anna Roberta, Karla e Emmanoela, pela compreensão, cumplicidade e amizade dentro e fora da UFPB;

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, especialmente a Irmã Ana e Irmã Rita pelas lições de comportamento;

A meus amigos e companheiros de laboratório: Abraão, Andrea, Elizama, Eliane, Ana Paula, Felipe, Fernanda, Geraldo, Mónica, Olga, Raquel, Remi, Rosana, Márcio e, em especial, à nossa técnica e amiga Fátima Costa, pelo suporte, dedicação e carinho transmitido a cada um de nós ao longo desses anos, muito obrigado Fifa!!!

A todos os meus amigos do DEA: Nenis, Fabi, Aninha, Carol Picone, Carol, Luis, Wagner, Lucas, Marcos, Vitor, Caiçara, Pitico, Roque, Lizi, Douglas, Hector, Gustavo, Lucielen, Gabriel, Nara, muito obrigado pela amizade e harmonia;

A meus companheiros de morada, Romildo, pela amizade e exemplo de dedicação, e ao César, pelas conversas, troca de idéias e conselhos, valeu bixo!!!

Aos meus amigões, Abraão, Geraldo, Alexandre, Giba, Louise e Elizama, pelos ótimos momentos vividos, pelas brincadeiras, fins de semana maravilhosos, pelas conversas e debates noturnos, através dos quais aprendi bastante sobre a vida. Vocês me apoiaram de verdade, muito obrigado!!!

A todos que contribuíram para realização desse trabalho.

SUMÁR	IO

LISTA DE FIGURASxi
LISTA DE TABELASxiii
NOMENCLATURAxiv
RESUMOxviii
ABSTRACTxix
1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA1
2 OBJETIVOS
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA4
3.1 ANTIBIÓTICOS β-LACTÂMICOS E β-LACTAMASES4
3.2 INIBIDORES DE β-LACTAMASES4
3.3 ÁCIDO CLAVULÂNICO5
3.4 HIDRÓLISE DO ÁCIDO CLAVULÂNICO
3.5 PURIFICAÇÃO DE ÁCIDO CLAVULÂNICO11
3.6 ZEÓLITAS
3.6.1 Definição e estrutura13
3.6.2 Estruturas cristalinas zeolíticas16
3.6.2.1 Zeólita A16
3.6.2.2 Zeólitas X e Y16
3.6.3 Propriedades
3.6.4 Aplicações biotecnológicas18
3.7 PROCESSOS CROMATOGRÁFICOS20
3.7.1 Adsorção21
3.7.2 Isotermas de adsorção22
4 MATERIAIS E MÉTODOS27
4.1 MATERIAIS27

4.1.1 Caldo fermentado27
4.1.2 Estudos de adsorção e separação27
4.2 MÉTODOS
4.2.1 Análise de concentração de AC28
4.2.1.1 Método Espectrofotométrico28
4.2.1.2 Método Cromatográfico29
4.2.2 Análise de concentração de proteínas30
4.2.3 Caracterização dimensional do AC
4.2.4 Troca iônica das zeólitas31
4.2.5 Cinética de adsorção31
4.2.6 Caracterização da zeólita selecionada32
4.2.6.1 Composição e densidade
4.2.6.2 Área superficial e estrutura porosa
4.2.6.3 Morfologia superficial
4.2.7 Porosidade do leito de partículas33
4.2.8 Obtenção de AC puro35
4.2.9 Isotermas de adsorção de AC35
4.2.10 Ensaios em coluna de leito fixo37
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO
5.1 CINÉTICA DE ADSORÇÃO DE AC41
5.1.1 Ensaios preliminares41
5.1.2 Seleção da zeólita adequada43
5.2 CARACTERIZAÇÃO DIMENSIONAL DO AC47
5.3 CARACTERIZAÇÃO DA ZEÓLITA 13X-Na48
5.3.1 Composição e densidade48
5.3.2 Área superficial e estrutura porosa49
5.3.3 Morfologia superficial52

5.4 POROSIDADE DO LEITO DE PARTÍCULAS	54
5.5 OBTENÇÃO DE SOLUÇÕES DE AC PURO	59
5.6 ISOTERMAS DE ADSORÇÃO DE AC	60
5.7 ENSAIOS EM COLUNA DE LEITO FIXO	64
5.7.1 Separação de AC referente às proteínas	66
5.7.2 Separação de AC referente aos contaminantes	74
6 CONCLUSÕES	78
7 LITERATURA CITADA	80

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Inibidores comerciais mais comuns (Buynac, 2006)5
Figura 2: Estrutura química do ácido clavulânico
Figura 3: Isômero E da molécula de AC 6
Figura 4: Isômero Z da molécula de AC 6
Figura 5: Esquema da síntese do AC e seus precursores mostrando o fluxo de
carbono (Li e Townsend, 2006)
Figura 6: Efeito do pH na constante de hidrólise de ácido clavulânico a 20ºC e força
iônica de 0,5 (Bersanetti <i>et al.,</i> 2000)
Figura 7: Rede tridimensional (4;2)-conectada e sua representação em uma
subunidade 2D (Braga e Morgon, 2007)
Figura 8: Unidades secundárias de construção, SBUs (Giannetto, 1990)14
Figura 9: Algumas unidades poliédricas de construção (Giannetto, 1990)15
Figura 10: Estruturas de alguns zeólitos. a: estrutura da faujasita natural ou dos
zeólitos X e Y sintéticos; b: estrutura do zeólito A, sintético; c: a estrutura da
sodalita (Giannetto, 1990)15
Figura 11: Cromatograma da HPLC de amostra padrão de AC (C _{AC} =250 mg/L) 29
Figura 12: Cromatograma da HPLC de caldo fermentado contendo AC 30
Figura 13: Sistema Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC) utilizado para
determinação da porosidade de leito
Figura 14: Esquema (a) e fotografia (b) do sistema cromatográfico com leito fixo de
zeólitas utilizado no presente trabalho
Figura 15: Curva cinética de adsorção de AC em ZN nas diferentes formas
catiônicas. $C_{AC0} = 250 \text{ mg/L}; T = 30^{\circ}C42$
Figura 16: Curva cinética de adsorção de AC em ZN nas diferentes formas
catiônicas. $C_{AC0} = 250 \text{ mg/L}; T = 15^{\circ}C44$
Figura 17: Curva cinética de adsorção de AC em 13X nas diferentes formas
catiônicas. $C_{AC0} = 250 \text{ mg/L}; T = 15^{\circ}C46$
Figura 18: Conformação 1 do isômero Z da molécula de AC 47
Figura 19: Conformação 2 do isômero Z da molécula de AC 47
Figura 20: Isômero E da molécula de AC
Figura 21: Isoterma de adsorção de nitrogênio a 77 K em 13X-Na 50
Figura 22: Ajuste da curva BET para 13X-Na (R ² = 0,9949) 50
Figura 23: Microscopia eletrônica de varredura (x 400) de zeólita 13X-Na 52
Figura 24: Microscopia eletrônica de varredura (x 2000) de zeólita 13X-Na 52
Figura 25: Microscopia eletrônica de varredura (x 5000) de zeólita 13X-Na 53
Figura 26: Microscopia eletrônica de varredura (x 5500) de zeólita 13X-Na 53
Figura 27: Primeiro momento de blue dextran para diferentes vazões no leito: com
zeólita 13X-Na (CZ) e sem zeólita (SZ) 54

Figura 28: Perfis de eluição de blue dextran na vazão 0,25 mL/min
Figura 29: Perfis de eluição de blue dextran na vazão 0,50 mL/min
Figura 30: Perfis de eluição de blue dextran na vazão 1,00 mL/min
Figura 31: Perfis de eluição de blue dextran na vazão 1,50 mL/min
Figura 32: Primeiro momento do leito para diferentes velocidades superficiais
(R ² =0,985)
Figura 33: Interstícios preenchidos com esferas de menor tamanho (Hirschhorn,
1969)
Figura 34: Efeito na densidade aparente da adição de finas partículas (-325 mesh,
menor que 0,044 mm) esféricas a uma distribuição (-100, +150 mesh) de partículas
de aço inox (Hirschhorn, 1969) 58
Figura 35: Regressão não-linear dos dados experimentais da isoterma de adsorção
de AC puro em 13X-Na a 10°C, segundo modelo de Langmuir ($R^2 = 0.946$) 61
Figura 36: Regressão não-linear dos dados experimentais da isoterma de adsorção
de AC puro em 13X-Na a 15ºC, segundo modelo de Langmuir (R ² = 0,883) 61
Figura 37: Regressão não-linear dos dados experimentais da isoterma de adsorção
de AC puro em 13X-Na a 20°C, segundo modelo de Langmuir ($R^2 = 0,990$)
Figura 38: Avaliação estatística da quantidade máxima de adsorção (qm) de AC em
13X-Na a diferentes temperaturas
Figura 39: Avaliação estatística da constante de dissociação (kD) de AC em 13X-Na
a diferentes temperaturas
Figura 40: Avaliação estatística do coeficiente de partição (k) de AC em 13X-Na a
diferentes temperaturas
Figura 41: Avaliação estatística da constante k _F de AC em 13X-Na a diferentes
temperaturas
Figura 42: Ensaio I4. Perfil cromatográfico de AC, absorbâncias (Abs) a 280 nm e
pH das amostras coletadas na saída da coluna de 13X-Na
Figura 43: Ensaio I4. Separação de AC e proteínas em coluna de 13X-Na 67
Figura 44: Ensaio I5. Perfil cromatográfico de AC, absorbâncias (Abs) a 280 nm e
pH das amostras coletadas na saída da coluna de 13X-Na
Figura 45: Ensaio I5. Separação de AC e proteínas em coluna de 13X-Na 69
Figura 46: Ensaio I6. Perfil cromatográfico de AC, absorbâncias (Abs) a 280 nm e
pH das amostras coletadas na saída da coluna de 13X-Na
Figura 47: Ensaio I6. Separação de AC e proteínas em coluna de 13X-Na70
Figura 48: Ensaio I7. Concentrações de AC na saída da coluna de 13X-Na, AD
como eluente75
Figura 49: Ensaio I8. Concentrações de AC na saída da coluna de 13X-Na, TF como
eluente

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Principais proces	sos cromato	ográfi	cos (Bersai	netti,	2001))		21
Tabela 2: Concentração	relativa	para	adsorção	de	AC	em	ZN	T=15°C;
t* = 40 min	•••••						•••••	45
Tabela 3: Concentração	relativa j	para	adsorção	de	AC	em	13X.	T=15°C;
t* = 40 min	••••••							46
Tabela 4: Composição da z	eólita 13X-I	Na						49
Tabela 5: Área superficial	específica ((Ѕвет),	volume de	e mio	cropo	ros ('	Vmicro),	volume
total de poros (Vporos) e diâr	netro médio	o de p	oros (D _{poro}	s) de	13X-1	Va		50
Tabela 6: Propriedades físi	co-estrutur	ais: co	mparação	com	a lite	ratur	a	51
Tabela 7: Primeiro momen	to de blue o	dextra	n para cac	la va	zão: c	com z	zeólita	13X-Na
(μ^{CZ}), sem zeólita (μ^{SZ}) e do	leito (difer	ença)	(μ ^L)	•••••				55
Tabela 8: Porosidade do lei	to de partí	culas:	comparaçã	ão co	m a li	iterat	ura	57
Tabela 9: Parâmetros do m	odelo Linea	ar para	a adsorção	de A	AC en	n 13X	-Na	60
Tabela 10: Parâmetros do r	nodelo Lan	Igmuii	r para adso	orção	de A	C em	13X-N	Na 60
Tabela 11: Parâmetros do r	nodelo Frei	undlir	ch para ac	lsorç	ão de	AC	em 13)	K-Na. 60
Tabela 12: Condições op	eracionais	dos	ensaios e	m co	oluna	de	leito	fixo de
13X-Na				•••••				66
Tabela 13: Avaliação da s	eparação e	m col	una de 13	X-Na	de A	AC e	proteí	nas nos
ensaios I4, I5 e I6	••••••			•••••				72
Tabela 14: Eficiência de sej	paração (ES	5) de f	rutose e gl	licose	e: influ	uênci	a da v	azão de
alimentação (v) e adição de	colunas en	n série	e (Lorenço	, 2004	4)			
Tabela 15: Porcentagens d	e área, fato	or de p	ourificação	refe	rente	aos o	contan	ninantes
(FPC) e fator de concentraç	ão (FC) do	ensaio	o I7	•••••				
Tabela 16: Porcentagens d	e área, fato	or de p	ourificação	refe	rente	aos o	contan	ninantes
(FPC) e fator de concentraç	ão (FC) do	ensaio	o I8	•••••				
Tabela 17: Comparação do	fator de pr	urifica	ção refere	nte a	os co	ntam	inante	s médio
(FPCMédio), fator de concent	ração médio	o (FC	1édio) e perc	entu	ais de	e mas	sa reci	uperada
de AC (MRAC) dos ensaios	7 e I8					••••••		

NOMENCLATURA

Abs – absorbância

- *A_{AC}* porcentagem de área do pico correspondente ao AC de amostra do caldo de fermentação antes da passagem pela coluna de zeólitas
- A_{AC}^{P} porcentagem de área do pico corresponde ao AC das amostras coletadas na saída da coluna de zeólitas
- AC ácido clavulânico
- AD água destilada
- AM amoxicilina
- C concentração do adsorbato em solução (ML-3)
- Co concentração inicial do adsorbato em solução (ML-3)
- C* concentração do adsobato em solução no equilíbrio (ML-3)
- CAC concentração de ácido clavulânico em solução (ML-3)
- CACO concentração inicial de ácido clavulânico em solução (ML-3)
- CBET constante de adsorção do modelo BET
- CP concentração de proteínas totais em solução (ML-3)
- CP0 concentração inicial de proteínas totais em solução (ML-3)
- D_{AC} diâmetro médio da molécula de AC (L)
- D_{poros} diâmetro médio de poros (L)
- d_A = densidade aparente (ML⁻³)
- dz = densidade da zeólita (ML-3)
- ES eficiência de separação
- FC fator de concentração
- FCMédio fator de concentração médio
- FE fator de empacotamento
- FPP fator de purificação referente às proteínas

FPC - fator de purificação referente aos contaminantes

FPC_{Médio} – fator de purificação médio referente aos contaminantes

- I1 a I8 injeções em coluna de leito fixo de zeólitas
- k coeficiente de partição (L3M-1)
- ka constante parcial de hidrólise em meios ácidos (T-1)
- kb constante parcial de hidrólise em meios básicos (T-1)
- kd constante de dissociação (MM-1)
- kD1 constante de dissociação do primeiro termo (modelo Langmuir duplo) (MM-1)
- kD2 constante de dissociação do segundo termo (modelo Langmuir duplo) (MM-1)
- k_F constante do modelo Freundlinch
- kh constante global de hidrólise (T-1)
- kn constante parcial de hidrólise em meios neutros (T-1)
- L comprimento do leito (L)
- M cátion de compensação da zeólita
- MRAC percentual de massa recuperada de AC
- MRP percentual de massa recuperada de proteínas
- m_z = massa de zeólita (M)
- N número de avogadro
- n_F índice do modelo Freundlinch
- q* quantidade adsorvida do adsorbato no equilíbrio em relação à quantidade de adsorvente (MM⁻¹)
- qm capacidade máxima de adsorção (MM-1)
- q_{m1} capacidade máxima de adsorção do primeiro termo (modelo Langmuir duplo) (MM⁻¹)
- q_{m2} capacidade máxima de adsorção do segundo termo (modelo Langmuir duplo) (MM⁻¹)
- V volume de gás adsorvido a pressão P (L³)

- Vestrutura volume ocupado pela estrutura dos sólidos (L3)
- Vinj volume de amostra injetada (L³)
- Vm volume de gás requerido para formar a monocamada (L3)
- V_{micro} volume de microporos (L³M⁻¹)
- Vocupado volume real ocupado pelos sólidos (L³)
- V_{poros} volume total de poros (L³M⁻¹)
- V_{sol} volume de solução (L³)
- v vazão de alimentação (L³T⁻¹)
- v₀ velocidade superficial (LT⁻¹)
- P/P₀ pressão relativa do adsorbato
- SBET área BET (L²M⁻¹)
- T temperatura (°C)
- TF tampão fosfato (0,2 M e pH 6,2)
- t tempo (T)
- t* tempo de equilíbrio (T)
- to tempo de injeção da amostra (T)
- Δt intervalo de amostragem (T)
- w número de moléculas de água
- ZN zeólita natural
- 13X zeólita sintética faujasita

Termos gregos

- $\epsilon_{\rm b}$ porosidade do leito
- ϵ_P porosidade da partícula
- μ primeiro momento (T)
- $\Delta \mu$ diferença entre primeiros momentos (T)
- δ^2 segundo momento (T²)

 λ – comprimento de onda (L)

Índices

- 1, 2 componente
- AC ácido clavulânico
- CZ com zeólita
- i componente
- j valência do cátion M
- L leito
- n número da fração
- P proteínas
- SZ sem zeólita
- x, y termos cuja soma resulta no número total de tetraedros das zeólitas
- z zeólita

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo principal a separação e purificação de ácido clavulânico a partir de caldo fermentado utilizando zeólitas. Foram utilizadas zeólita natural (ZN) e sintética faujasita (13X), ambas modificadas por troca iônica com diferentes cátions de compensação (Na⁺¹, K⁺¹, Ca⁺², Ba⁺², Mg⁺², Sr⁺²). Através de estudos cinéticos de adsorção de AC, usando as diferentes zeólitas nas respectivas formas catiônicas, selecionou-se a zeólita 13X-Na como a mais promissora na adsorção do referido composto. No equilíbrio, houve retenção de 17,4% do AC inicial (CAC*/CAC0 = 0,826) e a quantidade de AC adsorvida, em relação à quantidade de zeólita (q*) foi 0,4927 mg/g. O diâmetro médio da molécula de AC (DAC) foi estimado em 9,6 Å. A zeólita 13X-Na foi caracterizada em termos de composição (Si/Al = 1,5), densidade (dz = 2,248 g/cm3), área superficial $(S_{BET} = 444,860 \text{ m}^2/\text{g})$, volume total de poros $(V_{poros} = 0,308 \text{ cm}^3/\text{g})$, volume de microporos $(V_{micro} = 0,203 \text{ cm}^3/\text{g})$ e diâmetro médio de poros $(D_{poros} = 28 \text{ Å})$. Através desses resultados, a porosidade da partícula calculada foi $\varepsilon_{\rm P}$ = 0,69. O leito de partículas de 13X-Na apresentou porosidade ε_b = 0,85. Soluções de AC puro foram obtidas através de HPLC em escala semi-preparativa. Isotermas de adsorção nas temperaturas 10, 15 e 20°C, usando 13X-Na e soluções de AC puro, foram determinadas e constatou-se que, nos intervalos de temperaturas e concentrações estudados, o aumento da temperatura desfavoreceu tal processo. A partir de injeções de caldo fermentativo em coluna de leito fixo de zeólitas 13X-Na, foram observados melhores resultados na separação de ácido clavulânico 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.

Palavras-chave: Ácido clavulânico, Zeólitas, Purificação, Leito fixo.

ABSTRACT

In this research work, a method for separation and purification of clavulanic acid from a fermented medium was studied using natural and synthetic zeolites. The natural zeolite (ZN) and synthetic faujasite (13X) were modified by ionic exchange with different compensation cations (Na⁺¹, K⁺¹, Ca⁺², Ba⁺², Mg⁺², Sr⁺²). The kinetic analysis by adsorption of clavulanic acid indicated that the zeolite 13X-Na was the most promising for the adsorption of the related compound. At the equilibrium conditions, the retention was about 17.4% (C_{AC} */ C_{AC} = 0.826), where the amount adsorbed clavulanic acid relative to the amount of zeolite (q*) was 0.4927 mg/g. The average diameter of a clavulanic acid molecule (DAC) was estimated as 9.6 Å. The composition of the zeolite 13X-Na was characterized in terms of the ratio Si/Al (1.5), density (dz = 2.248 g/cm³), superficial area $(S_{BET} = 444.86 \text{ m}^2/\text{g})$, total pore volume $(V_{pores} = 0.308 \text{ cm}^3/\text{g})$, micropore volume $(V_{micro} = 0.203 \text{ cm}^3/\text{g})$ and average pore diameter ($D_{pores} = 28 \text{ Å}$). Accordingly, particle and bed porosity ($\epsilon_{\rm P}$ and $\epsilon_{\rm b}$) were calculated as 0.69 and 0.85 respectively. Solutions of pure clavulanic acid were obtained in semi-preparative scale HPLC. The adsorption isotherm for 13X-Na and solutions of pure clavulanic acid were determined for the temperatures of 10, 15 and 20°C, showing at increasing temperature, the performance of the process decreases. Addition of fermented medium in the fixed bed column of Zeolites 13X-Na improved the separation process between clavulanic acid and contaminant proteins, using as effluent phosphate buffer (0.2 M and pH 6.2) and zeolites with particle diameters in the range of 0.053 to 0.062 mm. The separation efficiency (ES), factor concentration (FC), purification factor, referred to proteins (FPP), and purification factor referred to the contaminants (FPC) were determined, as ES = 0.38, FC = 0.40, FPP = 1.25 and FPC = 1.28respectively.

Keywords: Clavulanic acid, Zeolites, Purification, Fixed bed.

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Os antibióticos β -lactâmicos foram descobertos no início do século vinte e representam cerca de 65% dos antibióticos comercializados no mundo inteiro. A penicilina e a cefalosporina são os de maior representatividade e foram os pioneiros dessa classe de antibióticos. Esses compostos vêm sendo usados até os dias atuais por apresentarem eficiência bastante significativa na inibição de microrganismos patogênicos (Buynac, 2006; Li e Townsend, 2006).

Entretanto, algumas bactérias em seu mecanismo de defesa produzem β -lactamases, compostos que hidrolisam os anéis β -lactâmicos, desenvolvendo cada vez mais resistência a esses antibióticos e, com isso, reduzindo suas eficiências. Como conseqüência, a indústria biotecnológica dedicou-se a investigar e descobrir algum tipo de substância que apresentasse propriedades inibitórias dessas enzimas. Na contemporaneidade, a busca por produtos anti β -lactamásicos ainda é significativamente expressiva (Buynac, 2006).

Em 1977, Reading e Cole publicaram um artigo sobre a descoberta de um eficiente inibidor de β -lactamases, o ácido clavulânico (AC). Trata-se de um metabólito secundário obtido a partir de *Streptomyces clavuligerus* que, apesar de não apresentar grande atividade contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, é considerado um "competidor imbatível" das β -lactamases.

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. De acordo com Morão *et al.* (2006), cerca de 50% do custo total de produção dos antibióticos

deve-se a etapa de purificação, trazendo novos desafios às indústrias no processo de *downstream* dos respectivos componentes.

Ultimamente, estudos vêm se dedicando a tecnologias alternativas de obtenção de antibióticos oriundos de meio fermentativo, visando a otimização dos processos e seus respectivos custos (Tessiera *et al.*, 2005; Wang e Chung, 2005; Li *et al.*, 2003; Brites Alves *et al.*, 2002), com destaque para o AC (Saudagar e Singhal, 2007; Teodoro *et al.*, 2006; Morão *et al.*, 2006; Bersanetti *et al.*, 2005). A indústria farmaucêutica tem demonstrado crescente interesse pelo AC, daí a importância da investigação dos métodos de obtenção com a finalidade de aperfeiçoar os mecanismos de separação e purificação.

Uma alternativa interessante é o estudo do uso de zeólitas, sólidos microporosos e cristalinos, de natureza inorgânica, contendo alumínio, silício e oxigênio arranjados em uma estrutura altamente regular. Podem ser de origem natural ou sintética e apresentam caráter microporoso com dimensão de poro uniforme, seletividade de adsorção pelo tamanho molecular, propriedades de troca iônica, habilidade de desenvolver acidez interna, estabilidade térmica e facilidade de ser regenerada (Burkert, 2003). Sendo assim, apresentam uma seletividade bem particular podendo ser utilizadas como "peneira molecular" nos processos de biosseparação.

2 OBJETIVOS

Perante a relevância do AC como inibidor de β -lactamases, evidenciada pelo seu intenso uso na indústria farmacêutica na combinação com antibióticos β -lactâmicos, e a necessidade de inovações tecnológicas na busca de processos alternativos de biosseparação, o presente trabalho teve como objetivo a caracterização da adsorção de AC em zeólitas bem como o estudo de separação e purificação do AC obtido por fermentação utilizando leito fixo de zeólitas.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

a) Estudos cinéticos de adsorção de AC, utilizando soluções de Clavulin[®], considerado padrão desse composto, e zeólitas modificadas por troca iônica com diferentes cátions de compensação, a fim de selecionar a zeólita e o cátion mais adequados ao estudo proposto;

b) Caracterização da zeólita selecionada, em termos de composição, densidade, área superficial e estrutura porosa;

 c) Obtenção de soluções de AC puro para a determinação de isotermas de adsorção em diferentes temperaturas;

 d) Verificação do comportamento da adsorção em coluna de leito fixo através da metodologia de respostas a pulsos cromatográficos e caracterização do leito de zeólitas através de sua porosidade;

e) Avaliação da separação do AC produzido por processo fermentativo, com a determinação da eficiência de separação (ES), fator de concentração (FC), fator de purificação referente às proteínas (FPP) e fator de purificação referente aos contaminantes totais (FPC).

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 ΑΝΤΙΒΙΌΤΙCOS β-LACTÂMICOS Ε β-LACTAMASES

A descoberta dos antibióticos β -lactâmicos no início do século vinte representou um ponto de partida no combate às bactérias patogênicas. Estes produtos semi-sintéticos, relativamente baratos e altamente eficientes, têm sido o foco principal da quimioterapia anti-infecciosa nos últimos sessenta anos (Buynac, 2006).

A penicilina e cefalosporina, foram os pioneiros no combate às infecções bacterianas. No entanto, seu uso em larga escala acabou reproduzindo uma redução de sua eficiência, devido à resistência adquirida pelos microrganismos patogênicos (Li e Townsend, 2006). Algumas bactérias patogênicas, em seu mecanismo de defesa, produzem β -lactamases, enzimas que hidrolisam os anéis β -lactâmicos dos antibióticos, como penicilina e cefalosporina, formando derivados de ácidos carboxílicos (penicilóico) ou subprodutos análogos (Baggaley *et al.*, 2003).

As duas formas mais comuns de resistência dos patogênicos aos β -lactâmicos são a produção de uma ou mais β -lactamases e o desenvolvimento de alterações em proteínas de ligação à penicilina (Lim e Strynadka, 2002).

Há quatro classes diferentes das β-lactamases, que vão de A a D. As enzimas das classes A, C, e D contêm sítio ativo constituído por resíduos de serina, enquanto que as da classe B são metalo-enzimas de zinco (Buynac, 2006).

3.2 INIBIDORES DE β -LACTAMASES

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 (Buynac, 2006). Uma estratégia razoavelmente eficaz no combate à resistência das β -lactamases é a combinação de antibióticos β -lactâmicos com um inibidor de uma ou mais enzimas hidrolíticas (Maiti *et al.*, 1998).

Existem atualmente no mercado vários produtos que combinam antibióticos com substâncias inibidoras de β-lactamases. Esses inibidores apresentam-se com maior freqüência na forma de sais de ácido clavulânico (AC), sulbactam e tazobactam (Payne *et al.*, 1994), cujas estruturas estão apresentadas na Figura 1. Podem ser citados o Augmentin[®] (amoxilina/AC) (Stein e Gurwith, 1984), Timentin[®] (ticarcilina/AC) (Reed, 1998), Unasyn[®] (ampicilina/sulbactam) (Lode, 2001) e o Zosyn[®] (piperacilina/tazobactam) (Bryson e Brogden, 1994) como exemplos desses produtos.



Figura 1: Inibidores comerciais mais comuns (Buynac, 2006).

3.3 ÁCIDO CLAVULÂNICO

A descoberta do AC 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 β-lactamases (Buynac, 2006).

O AC é um composto β -lactâmico, cuja molécula é produzida pelo microrganismo filamentoso *Streptomyces clavuligerus* e consiste em um anel β -lactâmico e um anel oxazolidino (Howarth *et al.*, 1976; Reading e Cole, 1977), como pode ser visto na Figura 2. Conforme Almeida (2003), juntamente com o AC, pelo menos mais 20 metabólitos secundários (incluindo outros compostos β -lactâmicos) são produzidos a partir dessa bactéria, que não é capaz de metabolizar a glicose.



Figura 2: Estrutura química do ácido clavulânico.

De acordo com essa estrutura química, a referida molécula apresenta a possibilidade de isomeria conformacional (isômeros E e Z). O tamanho (diâmetro equivalente) dessa molécula pode variar com essa conformação. Nas Figuras 3 e 4, são apresentados os isômeros E e Z da molécula de AC.



Figura 3: Isômero E da molécula de AC. Figura 4: Isômero Z da molécula de AC.

Apesar de não demonstrar grande eficiência no combate às bactérias patogênicas Gram-positivas e Gram-negativas (Kim *et al.,* 2001) apresenta

atividade anti β -lactamásica bastante significativa (Barboza *et al.*, 2003), isto é, atua como inibidor de enzimas β -lactamases, competindo com as mesmas e facilitando a ação dos respectivos antibióticos. Segundo Brown *et al.* (1976), em presença de baixas concentrações de AC, grande parte das bactérias produtoras de β -lactamases tornam-se tão sensíveis às penicilinas e cefalosporinas quanto outros microrganismos não produtores de β -lactamases.

Buynac (2006) constatou que o estudo do mecanismo de inativação de β -lactamases pelo AC iniciou-se no final dos anos 70 (Charnas *et al.*, 1978), e até hoje é usado como componente anti β -lactamásico, como visto anteriormente. Alguns relatos mostram que o AC é um inibidor mais potente do que o sulbactam para diversas β -lactamases de espectro expandido (Payne *et al.*, 1994). Pereira *et al.* (2003), avaliando a sensibilidade e a especificidade de testes de detecção da produção das enzimas citadas utilizando isolados de hemoculturas, observaram a excelência do teste com adição de AC.

De acordo com Elander (2003), os produtos comerciais a base de AC em maior destaque são o Augmentin[®] (amoxicilina/AC) e Timentin[®] (ticarcilina/AC), sendo prescritos em mais de 150 países gerando uma renda de 2 bilhões de dólares por ano. No Brasil, o antibiótico inibidor de β -lactamases mais comercializado é o Clavulin[®] (amoxicilina/AC).

Os precursores do AC são D-gliceraldeído-3-fosfato (G3P) (Khaleeli *et al.*, 1999) e L-arginina (Valentine *et al.*, 1993). Na Figura 5, está ilustrada sua rota biossintética, proposta por Li e Townsend (2006). Conforme tais autores, a fermentação do *S. clavuligerus* suplementada de arginina, desde que haja um monitoramento do metabolismo, pode mostrar resultados não só no tamanho intracelular daquele precursor, mas também na produção do AC.



Figura 5: Esquema da síntese do AC e seus precursores mostrando o fluxo de carbono (Li e Townsend, 2006).

3.4 HIDRÓLISE DO ÁCIDO CLAVULÂNICO

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 β-lactâmico está diretamente relacionada com a concentração de íons H⁺ e OH⁻ presentes em solução e com a temperatura (Bersanetti, 2001). Alguns autores sugeriram que a degradação do AC segue a cinética de pseudoprimeira ordem (Haginaka *et al.,* 1981; Bersanetti *et al.,* 2000), representada pela Equação 1.

$$\frac{-dC}{dt} = k_h C Eq. 1$$

Haginaka *et al.* (1981) estudaram a estabilidade do AC a 35°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 AC.

Bersanetti *et al.* (2000) concluíram que a estabilidade do AC, a 20°C e força iônica de 0,5, é maior a pH em torno de 6,0. Esses autores também relacionaram a constante de hidrólise de AC em solução aquosa com valores de pH (Figura 6), 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 6: Efeito do pH na constante de hidrólise de ácido clavulânico a 20ºC e força iônica de 0,5 (Bersanetti *et al.*, 2000).

Tendo em vista a dependência da velocidade de hidrólise de AC 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:

$$k_{h} = k_{a} [H^{+}] + k_{n} + k_{b} [OH^{-}]$$
 Eq. 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 AC a partir de diversas fontes, relataram que a estabilidade de AC diminui com o aumento da temperatura, independente da fonte, e que as constantes de degradação de AC de fermentação são maiores que aquelas obtidas nos experimentos em solução aquosa tanto em pH 6,2 quanto em pH 7,0. Os mesmos autores justificaram tal fato, possivelmente, pela presença de alguns componentes no meio fermentativo, como compostos amoniacais, que aumentam a instabilidade do AC.

Mayer e Deckwer (1996a) estudaram a produção e decomposição simultânea de AC durante cultivos com *Streptomyces clavuligerus* em meio complexo contendo extrato de soja. A estabilidade de AC *in vitro* (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* de AC, como indicado pela dependência da constante de degradação com o pH, alguns mecanismos adicionais estariam ativos na degradação *in vivo* de AC nos cultivos com meios contendo o extrato da farinha de soja.

3.5 PURIFICAÇÃO DE ÁCIDO CLAVULÂNICO

O processo de purificação do AC inclui uma série de etapas: depois da fermentação, o caldo é clarificado por filtração ou centrifugação sendo a massa celular de *Streptomyces clavuligerus* descartada.

Pesquisas verificaram que o isolamento primário do AC pode ser feito tanto por extração líquido-líquido como por adsorção (O'Sullivan e Sykes, 1986). Os autores mencionaram alguns trabalhos de recuperação do AC tais como: adsorção em carvão ativado seguida da eluição com acetona 90% (Cook *et al.*, 1981, *apud* O'Sullivan e Sykes, 1986), em resina Diaion PA 306 (Patente Japonesa, 1979, *apud* O'Sullivan e Sykes, 1986) bem como em Zerolite SRA61, seguida de eluição com cloreto de sódio e subseqüente dessalinização em Amberlite XAD4 ou resinas Hokeutsu (Box, 1980, *apud* O'Sullivan e Sykes, 1986).

Butterworth (1984) descreveu outro processo alternativo para a extração primária do AC 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) 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 AC. 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 AC, a resina XAD4 com sais de amônio quaternário mostrou melhor desempenho que IRA400.

Bersanetti (2001) pesquisou sobre a adsorção de AC em diferentes resinas de troca iônica. Com a determinação da faixa de pH de maior estabilidade do AC 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.

Almeida (2003) realizou estudos de adsorção de AC utilizando resinas de troca iônica IRA400 (no ciclo hidroxila e ciclo cloreto) e XAD4, sendo a IRA400 carregada com íons cloreto a selecionada como mais adequada. Fatores como concentração inicial de AC, fonte de AC e concentração de NaCl influenciaram no processo de adsorção, porém a influência da temperatura foi pequena. A variação da temperatura desfavoreceu o processo de adsorção de AC. O mesmo autor realizou modelagem e simulação para os processos de adsorção e dessorção de AC, puro bem como proveniente de caldo fermentativo, em IRA400 e determinou parâmetros de transporte e as constantes cinéticas intrínsecas de adsorção e dessorção e dessorção quanto pela transferência de massa. As difusividades efetivas foram influenciadas pela concentração inicial, concordando com Mayer *et al.* (1997).

3.6 ZEÓLITAS

3.6.1 Definição e estrutura

O primeiro zeólito mineral (stilbita) foi descoberto na Suécia, pelo Barão Cronstedt em 1756. No entanto, apenas em 1926 as características de adsorção desse material (em especial a chabazita) foram atribuídas aos pequenos poros de cerca de 5 Å de diâmetro, que possibilitam a inserção de pequenas moléculas excluindo as maiores, surgindo, assim, o termo "peneira molecular" (Braga e Morgon, 2007).

Conforme definição de Flaningen (1991), zeólitas são sólidos microporosos e cristalinos, de natureza inorgânica, contendo alumínio, silício e oxigênio arranjados em uma estrutura altamente regular, sendo representados pela seguinte fórmula estrutural:

$M_{x/j}$ [(A1O₂)_x (SiO₂)_y].wH₂O

Onde j é a valência do cátion M, w o número de moléculas de água e a soma entre x e y o número total de tetraedros.

As espécies são formadas por uma combinação tridimensional de tetraedros TO₄, interligados por átomos de oxigênio (Garcia *et al.*, 1999). A estrutura básica primária tetraédrica pode levar a redes tridimensionais bastante diversificadas, com várias lacunas e espaços vazios, que tornam as zeólitas importantes em processos de purificação, adsorção, catálise, entre outros.

Algumas disposições básicas dos tetraedros [SiO₄]⁴⁻ e [AlO₄]⁵⁻ geralmente são agrupadas em subestruturas que, por simplicidade, são representadas por arestas e vértices, onde os átomos Si, Al e O não são explicitamente mostrados (Figura 7). Em cada vértice estão os átomos T (Si, Al) e as arestas representam as pontes T-O-T, onde o O está aproximadamente a 0,3-0,7 Å da mediana. Cada vértice possui quatro ligações, conhecidos como 4-conectados, enquanto que os oxigênios são 2-conectados (Braga e Morgon, 2007).



Figura 7: Rede tridimensional (4;2)-conectada e sua representação em uma subunidade 2D (Braga e Morgon, 2007).

A maneira de encadear os tetraedros TO₄ gera as diferentes unidades secundárias de construção (SBU, Seconday Building Unit), que são o nível seguinte de organização da estrutura zeolítica. Na Figura 8, as letras C designam ciclos, D significam anéis duplos, isto é, dois ciclos unidos, e as letras T significam um tetraedro isolado.



Figura 8: Unidades secundárias de construção, SBUs (Giannetto, 1990).

Diferentes combinações das SBUs no espaço permitem a construção de unidades "terciárias", mais complexas. Várias formas de combinações são possíveis (Figuras 9 e 10), envolvendo unidades finitas e infinitas, como cadeias simples, duplas e triplas, malhas 2D e poliedros (Braga e Morgon, 2007).

Tais poliedros são também conhecidos como cavidades. A α -cavidade é um cubo-octaedro truncado e a β -cavidade, ou cavidade sodalita, é um octaedro truncado. A γ -cavidade tem também o nome de cavidade gmelinita e a ε -cavidade é também nomeada cavidade cancrinita. As denominações sodalita, gmelinita e cancrinita referem-se aos primeiros zeólitos conhecidos, cujas estruturas apresentam estas cavidades (Oliveira *et al.*, 2001).



Figura 9: Algumas unidades poliédricas de construção (Giannetto, 1990).



Figura 10: Estruturas de alguns zeólitos. a: estrutura da faujasita natural ou dos zeólitos X e Y sintéticos; b: estrutura do zeólito A, sintético; c: a estrutura da sodalita (Giannetto, 1990).

O encadeamento dessas estruturas leva à formação da rede cristalina constituída por microcristais com tamanho uniforme, denominados cristalitos, cujo diâmetro varia de acordo com o tipo de zeólita. A Figura 10a mostra a estrutura da zeólita natural faujasita. É possível observar a existência de anéis de quatro membros e de seis membros, de cavidades sodalita, além de prismas hexagonais. A conexão das cavidades sodalita através de suas faces hexagonais e por prismas permite o aparecimento de uma supercavidade, ou α -cavidade, com 13 Å de diâmetro. Duas outras opções de conexão das cavidades sodalita são possíveis: pelas faces quadradas através de um prisma quadrado, ou diretamente pelas faces quadradas, sem o prisma. A primeira gera o zeólito A, sintético sem análogo natural, com janelas de 4 Å (Figura 10b), e a segunda produz o mineral sodalita (Figura 10c), que também pode ser preparado em laboratório (Oliveira *et al.*, 2001).

3.6.2 Estruturas cristalinas zeolíticas

3.6.2.1 Zeólita A

Segundo Braga e Morgon (2007), a unidade de construção desse tipo é uma β -cavidade, também conhecida como cavidade sodalita, com 24 átomos T, seis anéis de 4 membros e oito anéis de 6. As cavidades sodalita são "fundidas" por anéis de 4, formando eixos de conexão cúbicos. A estrutura resulta em uma supercavidade com 11,4 Å, cortada por canais tridimensionais que se ligam por poros (aproximadamente) esféricos com oito oxigênios de 4,1 Å. Na Figura 10b observa-se o zeólito A. Esse tipo de zeólita apresenta uma relação Si/Al em torno de 1, menor que as observadas nas zeólitas X e Y, e um diâmetro equivalente de cristalitos entre 1,0 e 2,5 µm (Breck, 1974).

3.6.2.2 Zeólitas X e Y

São estruturalmente idênticas (Figura 10a). O que as diferenciam são suas razões Si/Al. Enquanto a zeólita X apresenta uma relação Si/Al entre 1 e 1,5, a

zeólito Y caracteriza-se por apresentar maior proporção de silício, com razão acima de 2,5. As zeólitas X apresentam diâmetro equivalente de cristalitos de aproximadamente 2,0 μm e as zeólitas Y entre 0,5 e 1,0 μm (Breck, 1974).

Sua unidade de construção também é uma cavidade sodalita, assim como a zeólita A. Mas estas cavidades são ligadas de modo distinto, pelas faces hexagonais com anéis duplos de 6 membros.

Este arranjo das unidades sodalitas leva à formação de uma cavidade maior, (supercavidade α), apresentando diâmetro interno de 11,8 Å, encontrandose também com 12,4 Å (Giannetto, 1989) e 13 Å (Oliveira *et al.*, 2001).

3.6.3 Propriedades

Devido à estrutura tridimensional de tetraedros TO₄, há formação de uma estrutura aberta, com grandes canais, retendo água, adsorbatos e compensadores de carga positiva (cátions) devido a presença do íon AlO⁴ na estrutura. Esses materiais apresentam uma área interna consideravelmente grande em relação a externa, conforme sua estrutura porosa, devido aos seus canais e cavidades (Pergher *et al.*, 1999).

As zeólitas apresentam uma combinação de propriedades que as tornam interessantes para várias aplicações, diferindo-as de outros materiais inorgânicos cristalinos: caráter microporoso com dimensão de poro uniforme, seletividade de adsorção pelo tamanho molecular, propriedades de troca iônica, habilidade de desenvolver acidez interna, estabilidade térmica (acima de 500°C) e facilidade de ser regenerada (Burkert, 2003).

As espécies apresentam semelhanças marcantes quanto às composições químicas e modo de ocorrência, densidade relativa entre 2 e 2,4, e a maioria fundese rapidamente com intumescência pronunciada, propriedade que lhe dá o nome, através da derivação das palavras gregas *zeo* (ferver) e *lithos* (pedra).
Uma outra propriedade importante das zeólitas é a "troca de base" ou a "troca de cátions", que ocorre quando passa uma solução aquosa através dos canais. Nesse processo, os íons em solução podem ser trocados por íons da estrutura. O comportamento das zeólitas no intercâmbio de íons depende de vários fatores, dentre os quais se destacam: a natureza da espécie catiônica, temperatura da troca, concentração dos compostos contidos na solução, íons associados à cátions da solução, o solvente utilizado e características estruturais particulares da zeólita utilizada (Garcia *et al.*, 1999).

A água dos canais desprende-se facilmente e de maneira contínua com o aquecimento, deixando a estrutura intacta, ao contrário do que ocorre com várias espécies com água estrutural, em que a retirada da água causa o desabamento da estrutura, como no caso da gipsita. Após a desidratação completa de uma zeólita, os canais podem ser preenchidos novamente com água ou com amônia, vapor de mercúrio, vapor de iodo ou uma variedade de outras substâncias. Este processo é seletivo e depende da estrutura particular da zeólita e do tamanho das moléculas, assim podendo ser usadas como "peneiras moleculares".

3.6.4 Aplicações biotecnológicas

As zeólitas apresentam área superficial interna bastante elevada devido aos canais ou poros distribuídos uniformemente ao longo do cristal. O efeito de peneira molecular é causado pelas diferenças de dimensão e forma entre os poros dos cristais e as moléculas a serem adsorvidas, conferindo seletividade para distintas moléculas. Esse efeito pode ser total ou parcial: se total, a difusão de uma espécie para o interior da partícula é impedida, enquanto que a difusão de uma segunda espécie ocorre; se parcial, ambos componentes da mistura se difundem no interior da partícula, porém a diferentes taxas (Burkert, 2003).

As zeólitas constituem um material promissor nos fenômenos que envolvem biosseparação. Vários são os trabalhos que investigam a utilização desses sólidos na purificação de substâncias como frutose, glicose, dextranas, proteínas, enzimas entre outros (Chang *et al.*, 2006; Burkert, 2003; Seetharam e Saville, 2002; Yu *et al.*, 1998; Ahmed *et al.*, 1998; Huang *et al.*, 1995).

Alguns autores descrevem esses adsorventes como suportes em hidrólises enzimáticas catalisadas por cutinase (Serralha *et al.*, 2002; Serralha *et al.*, 2000; Serralha *et al.*, 1998), lipase (Knezevic *et al.*, 1998; Lie e Molin, 1991), tirosinase (Seetharam e Saville, 2002) e lisozima (Chang *et al.*, 2006), supostamente alocados nos vacúolos intercristalinos.

Kuhn (2006) efetuou separação de oligossacarídeos utilizando colunas em série com zeólitas Y e obteve valores de eficiência de separação de 0,60 para oligossacarídeos e glicose, 1,00 para oligossacarídeos e frutose, 0,22 para oligossacarídeos e sacarose, 0,43 para glicose e frutose, 0,82 para glicose e sacarose e 1,23 para frutose e sacarose.

Burkert (2003) obteve bons resultados na separação de glicose, frutose e dextranas em zeólitas Y modificadas com íons Ba²⁺, alcançando eficiências de separação de 1,94 para o sitema glicose/frutose e de 2,72 para dextrana/frutose. Esse autor realizou estudos cinéticos, obteve isotermas de adsorção e determinou parâmetros de equilíbrio e de transporte nas zeólitas citadas.

Yu *et al.* (1998) utilizaram zeólitas X na separação de transferrina, albumina e imunoglobulina G. Para tal, procedeu-se uma etapa de desaluminação da zeólita. Os autores concluíram que a imunoglobulina G pode ser purificada por zeólitas a partir de misturas diversas de proteínas.

Huang *et al.*, 1995 realizaram trabalhos referentes à purificação de proteínas a partir de misturas binárias e ternárias de transferrina, albumina e γ -globulina em formas modificadas de zeólitas A.

Desse modo, a utilização de zeólitas ao longo do processo de obtenção de biomoléculas, como o AC por exemplo, constitue em uma alternativa para a separação desses compostos em relação a contaminantes de diferentes pesos molares, como carboidratos, proteínas, peptídeos e/ou aminoácidos, possivelmente presentes em caldos produzidos em processos fermentativos.

3.7 PROCESSOS CROMATOGRÁFICOS

A cromatografia é um método físico-químico de separação dos componentes de uma mistura, realizada através da distribuição desses componentes entre duas fases, que estão em contato íntimo. Uma das fases permanece estacionária enquanto a outra move-se através dela. Durante a passagem da fase móvel sobre a fase estacionária, os componentes da mistura são distribuídos, entre as duas fases, de tal forma que cada um dos componentes é seletivamente retido pela fase estacionária, resultando em migrações diferentes desses componentes (Collins *et al.*, 1995).

Existem diversos critérios para classificação dos processos cromatográficos, dentre os quais, Collins *et al.* (1995) destacaram: o tipo de técnica empregada, mecanismo de separação envolvido e tipos de fases utilizadas. Esses autores consideram como a classificação mais importante a baseada no mecanismo de separação, que pode ser por processos físicos, químicos ou mecânicos.

Conforme relatado por Bersanetti (2001), a purificação de substâncias por cromatografia é baseada na alta seletividade deste procedimento. A separação dos componentes, presentes na mistura ou extrato bruto, é conseguida através das diferenças nas intensidades ou energias das interações dos diversos componentes com a fase estacionária. Assim, existem vários tipos de cromatografia, de acordo

com a natureza das forças de ligação e com o princípio de separação (Tabela 1) (Schmidt-Kastner e Golker, 1987).

Técnica	Princípio	Tipo de separação		
Cromatografia de adsorção	Interações superficiais	Afinidade com a superfície		
Cromatografia de troca iônica	Interações iônicas	Carga		
Cromatografia de exclusão	Difusão nos poros	Tamanho molecular		
Cromatografia de afinidade	Adsorção bioespecífica	Estrutura molecular		
Cromatografia de partição	Equilíbrio de partição	Polaridade		

Tabela 1: Principais processos cromatográficos (Bersanetti, 2001).

3.7.1 Adsorção

A adsorção é uma técnica cromatográfica na qual se usa uma coluna recheada com um sólido (fase estacionária) e uma fase móvel líquida, onde a sorção isotérmica (adsorção) refere-se a um aumento da concentração do material (que está em excesso na fase móvel) entre as superfícies das fases móvel e estacionária (Collins *et al.*, 1995).

Para Almeida (2003), o processo de adsorção pode ser subdividido em três tipos: adsorção física ou fisissorção, adsorção química ou quimissorção, adsorção específica que pode ser por bioafinidade ou por exclusão de tamanho. A seguir, detalhamento de cada processo proposto por esse autor.

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, que são de intensidade fraca ou moderada. O equilíbrio é geralmente fraco e reversível, já que a energia requerida para a dessorção é pequena.

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, necessitando, ocasionalmente, de uma energia de ativação, apresentando freqüentemente irreversibilidade.

Na adsorção de troca iônica, a fase estacionária é altamente carregada e solutos carregados com carga contrária são seletivamente adsorvidos. Esses solutos podem ser então eluídos a partir de deslocamentos por outros íons, com o mesmo tipo de carga, porém com maior força de interação com a fase estacionária.

A adsorção por bioafinidade baseia-se principalmente nas propriedades biológicas ou funcionais do adsorvente e do adsorbato. O princípio desse fenômeno é o isolamento seletivo de macromoléculas biológicas através das propriedades dessas substâncias de se unirem reversivelmente a ligantes específicos.

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

3.7.2 Isotermas de adsorção

A afinidade de um determinado adsorvente por um adsorbato pode ser obtida experimentalmente através da isoterma de adsorção para o sistema em estudo. Essas isotermas descrevem quantitativamente o equilíbrio de distribuição de um soluto entre as duas fases envolvidas no processo de adsorção, em uma ampla faixa de concentrações (Bersanetti, 2001).

Os modelos comumente citados na literatura são o Linear, Langmuir e Freundlinch (Chang *et al.*, 2006; Almeida, 2003; Mayer e Deckwer, 1996b; Gosling *et al.*, 1989; Belter *et al.*, 1988). A Equação 3 representa o modelo Linear.

$$q^* = kC^*$$
 Eq. 3

Onde:

q* = quantidade adsorvida do adsorbato no equilíbrio;

k = coeficiente de partição;

C* = concentração do adsorbato em solução no equilíbrio.

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 4 descreve a isoterma de Langmuir.

Onde:

q_m = capacidade máxima de adsorção; k_D = constante de dissociação. 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 5). 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).

$$q^* = \frac{q_{m1}C^*}{k_{D1} + C^*} + \frac{q_{m2}C^*}{k_{D2} + C^*}$$
 Eq. 5

A isoterma de Freundlich (Equação 6) 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 (Claudino, 2003).

$$q^* = k_F (C^*)^{n_F}$$
 Eq. 6

Onde:

k_F = constante do modelo Freundlinch;

n_F = índice do modelo Freundlinch.

A equação BET de Brunauer-Emmet-Teller (Equação 7) 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 7 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).

$$\frac{1}{V\left[\left(\frac{P_0}{P}\right)-1\right]} = \frac{1}{V_m C_{BET}} + \left(\frac{C_{BET}-1}{V_m C_{BET}}\right)\frac{P}{P_0}$$
 Eq. 7

Sendo:

$$s = \frac{1}{V_m C_{BET}}$$
 Eq. 8

$$i_{BET} = \frac{C_{BET} - 1}{V_m C_{BET}}$$
 Eq. 9

$$V_m = \frac{1}{s + i_{BET}}$$
 Eq. 10

$$S_{BET} = \frac{V_m N}{22,414}$$
 Eq. 11

Onde:

V = volume de gás adsorvido a pressão P;

V_m = volume de gás requerido para formar a monocamada;

P/P₀ = pressão relativa do adsorbato;

CBET = constante de adsorção (relacionada com a entalpia de adsorção);

N = número de avogadro;

SBET = área BET.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Este trabalho faz 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.

4.1 MATERIAIS

4.1.1 Caldo fermentado

Os caldos de fermentação, utilizados nos ensaios de coluna de leito fixo, foram disponibilizados pelo Laboratório de Engenharia Bioquímica/DEQ/UFSCar. Os respectivos cultivos foram realizados a partir da linhagem selvagem de *Streptomyces clavuligerus*, com meio complexo contendo glicerol e proteína isolada de soja como fontes de carbono e nitrogênio, respectivamente. Após a fermentação, o caldo foi centrifugado, microfiltrado (em filtros com tamanho de poro de 0,2 µm) e armazenado em ultrafreezer na temperatura de -70°C e pH 6,2.

4.1.2 Estudos de adsorção e separação

- a) Zeólita natural Clinoptilolita-Mordenita (ZN) e zeólita sintética do tipo faujasita NaX (13X) na forma sódica, fornecidas por Celta Brasil Ltda e Plury Química Ltda, respectivamente;
- b) Produto farmacêutico Clavulin[®] (125 mg de AC + 500 mg de amoxicilina) fabricado por GlaxoSmithkline México, S. A. de C. V. – México.

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Análise de concentração de AC

A concentração de AC em todos os ensaios realizados nesse trabalho foi quantificada espectrofotometricamente, com exceção de dois experimentos em coluna de leito fixo (I7 e I8), onde realizou-se a referida análise por HPLC.

4.2.1.1 Método Espectrofotométrico

Esse método foi desenvolvido por Bird *et al.* (1982) e consiste na análise espectrofotométrica do produto da derivatização de AC com imidazol. Foram preparadas duas soluções diferentes (A e B) em tubos de ensaio, com uma dada amostra. Para a solução A, adicionou-se 5 mL de imidazol (60g/L e pH 6,8) a 1 mL de amostra, sendo o branco composto pela solução resultante da mistura de 5 mL de imidazol e 1 mL de água. Para a solução B, adicionou-se 5 mL de água destilada a 1 mL de amostra, sendo o branco a água destilada. As soluções foram aquecidas a 30°C por 15 min. Resfriou-se as soluções e as absorbâncias das soluções A e B foram medidas a λ = 312 nm em espectrofotômetro DU® 640 (Beckman Coulterm, USA). É importante ressaltar que a relação entre as diferenças de absorbâncias e a concentração de AC é linear até 50 mg/L. Logo, as amostras foram diluídas adequadamente. Na obtenção da curva de calibração foram preparadas soluções padrões de AC (na forma de clavulanato de potássio) de 10, 20, 30, 40 e 50 mg/L a partir de Clavulin®, e os valores experimentais de concentração de AC e de diferenças de absorbância relacionados por regressão linear.

4.2.1.2 Método Cromatográfico

Desenvolvido por Foulstone e Reading (1982) e adaptado por Gouveia et al. (1999), onde a reação com imidazol não é realizada, sendo detectados picos referentes a outros compostos. Assim, os picos correspondentes à amoxicilina (AM) (do padrão Clavulin[®]) e de outros metabólitos (do caldo de fermentação) também aparecem nos cromatogramas. Foram usados um sistema de bombeamento, detector de comprimento de onda UV-VIS e injetor automático de amostras modelos 9010, 9050 e 9095 (Varian Inc., USA), respectivamente, termostato de coluna SPH99 (Spark Holland, Emmen, Holanda) e software Millennium Chromatography Manager v. 2.10 (Waters, Milford, USA). Foram usadas, como fase móvel e estacionária, solução de KH2PO4 (50 mM) em pH 4,5 com hidróxido de potássio e uma coluna C-18 µ-Bondapak (3,9 x 300 mm), respectivamente, de acordo com as seguintes condições: 28ºC, fluxo de 1,4 mL/min e comprimento de onda na detecção (UV) λ = 227 nm. A curva de calibração foi construída a partir do padrão de AC (Clavulin®). Na Figura 11 está ilustrado um cromatograma obtido com injeção de AC padrão (250 mg/L) e na Figura 12 com injeção de caldo fermentado.



Figura 11: Cromatograma da HPLC de amostra padrão de AC (CAC=250 mg/L).



Figura 12: Cromatograma da HPLC de caldo fermentado contendo AC.

4.2.2 Análise de concentração de proteínas

As concentrações de proteínas foram determinadas segundo método proposto por Lowry *et al.* (1951). O princípio do método baseia-se numa mistura contendo molibdato, tungstato e ácido fosfórico (reagente Folin-Ciocalteau), que sofre uma redução quando reage com proteínas, na presença do catalisador cobre (II), e produz um composto com absorção máxima em λ = 750 nm. Para o branco, foi utilizada água destilada no lugar da amostra e a curva de calibração foi construída a partir de albumina bovina padrão (Sigma Co.) nas concentrações 20, 50, 100, 150 e 200 mg/L.

4.2.3 Caracterização dimensional do AC

Realizou-se uma estimativa do diâmetro da molécula de AC, com uso do software de cálculo de estrutura eletrônica Gaussian 03 (Frisch *et al.*, 2004), através da programação semi-empírica AM1, rotina empregada no Departamento de Química Orgânica do Instituto de Química da UNICAMP.

4.2.4 Troca iônica das zeólitas

Inicialmente, as zeólitas foram trituradas com Moinho Tecnal TE-631 e peneiradas com um agitador de peneiras magnético Bertel. Foram utilizadas frações na granulometria de 0,062-0,150 mm. Testou-se os dois tipos de zeólitas, ZN e 13X, em outras formas catiônicas (Na⁺¹, K⁺¹, Ca⁺², Ba⁺², Mg⁺², Sr⁺²), obtidas através de troca iônica com soluções dos respectivos sais.

A metodologia utilizada foi a mesma adotada por Silva (1998). As trocas foram realizadas em reator em batelada contendo água, onde foi adicionada a zeólita, mantendo-se o sistema sob agitação por uma hora. A temperatura foi ajustada em 75°C através de banho termostatizado, e o pH entre 5,0 e 6,0, pela adição de solução de HCl 6%. Foi adicionada então a solução salina, mantendo-se a agitação por 24 horas. A quantidade de íons para troca foi calculada pelo número de equivalentes grama de Na₂O presente na zeólita, e as quantidades de zeólita, água e solução salina para resultar em 15% de sólidos no reator. A suspensão foi então filtrada em funil de Büchner e a torta lavada na mesma temperatura de troca, primeiramente com a mesma quantidade de sal utilizada na troca em um volume de água deionizada igual ao do reator, e após somente com água destilada, em um volume duas vezes maior. Em seguida, foi feita a secagem em estufa a 120°C por 24 horas e armazenamento em frascos de vidro e temperatura ambiente.

4.2.5 Cinética de adsorção

Primeiramente, as zeólitas foram hidratadas pela adição de 5 mL de água destilada para cada 1 g de zeólita (com determinação prévia da umidade), sendo o sistema mantido sob agitação a 30°C por 2h. Os estudos cinéticos de adsorção foram realizados através de experimentos efetuados em reatores de vidro encamisados, contendo solução de AC e zeólitas na proporção massa de

sólido/volume de suspensão de 1:20 (1 g de zeólita para cada 20 mL de solução), com agitação mecânica e controle de temperatura com banho termostatizado. Foram retiradas alíquotas em intervalos de tempo definidos e a concentração de AC analisada. A zeólita mais adequada para adsorção de AC foi selecionada segundo esses experimentos e utilizada nos ensaios subseqüentes.

4.2.6 Caracterização da zeólita selecionada

A zeólita foi caracterizada em relação à composição, densidade, área superficial e estrutura porosa. Foram obtidas imagens da morfologia superficial da zeólita.

4.2.6.1 Composição e densidade

Determinou-se a composição da zeólita através de Espectrometria de Fluorescência de Raios X, usando um espectrômetro Philips, PW 2404, no Laboratório de Geoquímica Analítica do Instituto de Geociências da UNICAMP.

Para a determinação da densidade, utilizou-se um picnômetro multivolume 1305 Micrometrics.

4.2.6.2 Área superficial e estrutura porosa

A isoterma de adsorção de nitrogênio representa a rotina mais usada para determinar a área superficial específica e caracterizar a estrutura porosa dos sólidos. A mesma foi obtida na temperatura de 77 K em equipamento Quantachrome Nova 1200, no intervalo $0,05 < P/P_0 < 1,00$, no Laboratório de Análises Térmicas/DEQ/UFSCar.

Calculou-se a área superficial específica (SBET), volume total de poros (V_{poros}), volume de microporos (V_{micro}) e diâmetro médio de poros (D_{poros}), através do ajuste da equação BET linear (Equação 7), no intervalo 0,05 < P/P₀ < 0,29, e da

distribuição de tamanho de poros (método BJH), com auxílio do software Autosorb for Windows[®] v. 1.19.

BET:
$$\frac{1}{V\left[\left(\frac{P_0}{P}\right) - 1\right]} = \frac{1}{V_m C_{BET}} + \left(\frac{C_{BET} - 1}{V_m C_{BET}}\right) \frac{P}{P_0}$$

4.2.6.3 Morfologia superficial

Imagens foram captadas usando Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) com microscópio JSM-5900LV, no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron.

4.2.7 Porosidade do leito de partículas

Utilizou-se as zeólitas na granulometria 0,053 - 0,062 mm. A porosidade foi determinada pelo método do primeiro momento descrito por Arnold *et al.* (1985) e utilizado por Burkert (2003). Este método consiste na análise da resposta obtida após um pulso de traçador na coluna, na presença e ausência de material adsorvente. Blue dextran (Sigma Co.) de peso molecular 2000 kDa, na concentração de 2,5% p/v, foi utilizada como traçador.

Uma coluna Pharmacia C10/20, com leito de 1 cm de altura e 1 cm de diâmetro, foi acoplada ao equipamento FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography – Pharmacia LKB). Com um detector UV (λ = 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 zeólitas. Na Figura 13, é mostrado o sistema FPLC utilizado.



Foto: Marcus Forte

Figura 13: Sistema Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC) utilizado para determinação da porosidade de leito.

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 zeólita para cada velocidade superficial (ou vazão de alimentação). Arnold *et al.* (1985) propuseram que o momento para o leito é dado pela Equação 12:

$$\mu^{L} = \mu^{CZ} - \mu^{SZ} = \frac{L}{v_0} \left[\varepsilon_b + (1 - \varepsilon_b) \varepsilon_p \right] + \frac{t_0}{2}$$
 Eq. 12

Onde:

- μ = primeiro momento;
- L = altura do leito;
- v₀ = velocidade superficial;

to = tempo de injeção da amostra;

 ε_b = porosidade do leito;

 ε_p = porosidade da partícula.

Os índices "L", "CZ" e "SZ" correspondem a: "leito", "com zeólita" e "sem zeólita", respectivamente.

Para uma substância não-adsorvida no interior dos poros a equação reduz-se a:

$$\mu^{L} = \mu^{CZ} - \mu^{SZ} = \frac{L}{v_{0}} \varepsilon_{b} + \frac{t_{0}}{2}$$
 Eq. 13

Pela Equação 13, plotando-se μ^{L} *versus* L/v₀ para a respectiva velocidade superficial, tem-se uma reta cuja inclinação corresponde à porosidade do leito (ϵ_{b}).

4.2.8 Obtenção de AC puro

Essa etapa foi desenvolvida devido à necessidade de uma solução com grau de pureza confiável para construção das isotermas de adsorção. Foi usado um sistema HPLC, condicionando metodologia proposta por Foulstone e Reading (1982) e adaptada por Gouveia *et al.* (1999), porém com uma coluna semipreparativa C-18 μ-Bondapak (19 x 300 mm) e vazão de 5 mL/min. Foi injetada uma solução padrão concentrada, a partir de Clavulin[®], e as frações do pico correspondente ao AC coletadas e armazenadas sob refrigeração em pH 6,2.

4.2.9 Isotermas de adsorção de AC

Realizadas nas temperaturas de 10, 15 e 20ºC, em reatores de vidro encamisados, contendo solução de AC puro e zeólitas na proporção massa de sólido/volume de suspensão de 1:20 (1 g de zeólita para cada 20 mL de solução), com agitação mecânica e controle de temperatura através de banho termostatizado. Diferentes concentrações foram obtidas por diluições e, devido à instabilidade do AC, a faixa de concentração estudada foi de até 150 mg/L, aproximadamente. Após o tempo de equilíbrio (t*), definido com base nos estudos de cinética de adsorção, as concentrações finais foram analisadas, obtendo-se as isotermas de equilíbrio. A quantidade de AC adsorvida no equilíbrio foi calculada a partir da Equação 14:

$$q^* = \frac{(C_o - C^*)V_{sol}}{m_z}$$
 Eq. 14

Onde:

- q* = quantidade adsorvida do adsorbato no equilíbrio em relação à
 quantidade de adsorvente;
- C₀ = concentração inicial do adsorbato em solução;
- C* = concentração do adsorbato em solução no equilíbrio;
- V_{sol} = volume de solução;

m_z = massa de zeólita.

Os ajustes dos dados e estimação dos parâmetros foram efetuados com auxílio da ferramenta Nonlinear Estimation do software Statistica (StatSoft, Inc., USA), conforme os modelos Linear, Langmuir e Freundlinch (Equações 3, 4 e 6, respectivamente), com a finalidade de definir o que melhor descreve o processo.

Linear: $q^* = kC^*$

Langmuir:
$$q^* = \frac{q_m C^*}{k_p + C^*}$$

Freundlinch: $q^* = k_F (C^*)^{n_F}$

4.2.10 Ensaios em coluna de leito fixo

Na Figura 14a está o esquema da montagem experimental para os estudos de adsorção em leito fixo. Foi utilizada uma coluna encamisada, com 1 cm de diâmetro interno e altura de leito igual a 50 cm, contendo a zeólita nas granulometrias 0,062 - 0,088 e 0,053 - 0,062 mm. Os ensaios foram realizados a 15°C utilizando o método de pulso cromatográfico: um pulso de 2 mL do caldo de fermentação contendo AC foi injetado na coluna através da passagem contínua e descendente de eluente, água destilada ou tampão fosfato (0,2 M e pH 6,2), com vazão de 0,13 mL/min controlada por uma bomba Ismatec[®].



(a)



(b)

Figura 14: Esquema (a) e fotografia (b) do sistema cromatográfico com leito fixo de zeólitas utilizado no presente trabalho.

Foram coletadas amostras na saída da coluna em intervalos de tempos de finidos. Os valores de pH foram analisados e determinou-se os tempos de retenção dos componentes tal como eficiências de separação (ES), conforme Equações 15, 16, 17, 18 e 19. A separação de AC também foi avaliada de acordo com o fator de concentração (FC), fator de purificação referente às proteínas (FPP) e fator de purificação referente aos contaminantes totais (FPC), definidos nas Equações 20, 21 e 22, respectivamente.

$$(ES)_{12} = \frac{\Delta t_{12}}{\delta_{12}} \qquad Eq. 15$$

$$\delta_{12} = (\delta_1 \delta_2)^{1/2} \qquad \qquad Eq. 16$$

$$\Delta t_{12} = |\mu_1 - \mu_2|$$
 Eq. 17

$$\mu = \frac{\sum_{i=1}^{n} C_i t_i \Delta t_i}{\sum_{i=1}^{n} C_i \Delta t_i}$$
 Eq. 18

$$\delta^{2} = \frac{\sum_{i=1}^{n} C_{i} (t_{i} - \mu)^{2} \Delta t_{i}}{\sum_{i=1}^{n} C_{i} \Delta t_{i}}$$
 Eq. 19

Onde μ e δ^2 são, respectivamente, o primeiro e o segundo momento para cada componente, C_i é a concentração do componente na fração i, t_i o respectivo tempo e Δ t_i o intervalo de amostragem.

$$FC = \frac{C_{AC}}{C_{AC0}}$$
 Eq. 20

$$FPP = \frac{C_{AC}C_{P0}}{C_{AC0}C_{P}} \qquad \qquad Eq. 21$$

Onde:

CAC0 = concentração inicial de AC;

C_{AC} = concentração de AC;

CP0 = concentração inicial de proteínas;

C_P = concentração de proteínas.

$$FPC = \frac{A_{AC}^{P}}{A_{AC}}$$
 Eq. 22

Onde A_{AC} é a porcentagem de área do pico correspondente ao AC de amostra do caldo de fermentação antes da passagem pela coluna e A_{AC}^{P} é a porcentagem de área do pico corresponde ao AC das amostras coletadas na saída da coluna de zeólitas.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para seleção da zeólita mais adequada na adsorção de AC, quanto ao tipo (ZN ou 13X) e à forma catiônica (Na⁺¹, K⁺¹, Ca⁺², Ba⁺², Mg⁺², Sr⁺²), realizada através de estudos cinéticos de adsorção, foram usadas soluções consideradas padrão de AC (Clavulin[®]). Também conforme esses experimentos, determinou-se o tempo de equilíbrio de adsorção (t*). Realizou-se três repetições para cada ensaio e as respectivas análises foram feitas em duplicata.

Nos experimentos referentes à determinação das isotermas de adsorção, usou-se soluções de AC puro, obtidas através de HPLC. Realizou-se três repetições para cada ensaio e as respectivas análises foram feitas em duplicata.

Nos ensaios de coluna de leito fixo, utilizou-se soluções de AC produzido através de processo fermentativo (caldo de fermentação), com a finalidade de avaliar a separação em relação a proteínas e a contaminantes totais. As análises referentes às concentrações dos respectivos componentes (AC e proteínas) foram realizadas em duplicata.

5.1 CINÉTICA DE ADSORÇÃO DE AC

5.1.1 Ensaios preliminares

Ensaios preliminares foram realizados para verificar se a solução padrão de AC era estável a 30ºC. Até 250 min, o padrão de AC (C_{AC} = 250 mg/L) manteve sua concentração inicial.

Nos primeiros experimentos, feitos com ZN trocada com Ba²⁺ (ZN-Ba), foi constatado que a concentração de AC aumentava com o tempo, o que pode ser explicado pela alta capacidade que as zeólitas apresentam de reter água, causando a concentração da solução inicial. Burkert (2003), estudando separação de carboidratos (glicose, frutose e dextranas) com diversos tipos de zeólitas (Na₈₆X, Na₅₆Y e Baylith WE 894), também relatou esse fenômeno. O mesmo autor procedeu, então, uma hidratação das zeólitas, etapa esta também realizada neste trabalho.

Em seguida, foram realizados ensaios de adsorção usando soluções com concentração inicial C_{ACO} = 250 mg/L, e obtidas curvas cinéticas na temperatura de 30°C, utilizando ZN trocada com os respectivos íons, conforme Figura 15.



Figura 15: Curva cinética de adsorção de AC em ZN nas diferentes formas catiônicas. C_{AC0} = 250 mg/L; T = 30^oC.

Barboza *et al.* (2003) e Bersanetti (2001) obtiveram curvas cinéticas de adsorção de AC usando resinas de troca iônica cuja adsorção é bem mais expressiva. Nesses estudos foi verificada uma queda mais pronunciada no valor da concentração de AC. No processo em estudo, tem-se majoritariamente adsorção específica por exclusão, conforme definição relatada por Almeida (2003), e fisissorção através da retenção do componente no interior na estrutura microporosa da zeólita e, portanto, uma interação iônica relativamente menos representativa. Dessa maneira, observa-se um processo de adsorção

comparativamente mais lento, quando comparado com os dos autores citados. Por essa razão, adotou-se intervalos de tempo maiores.

Observa-se também que há baixa retenção de AC na zeólita em questão (concentrações em solução finais próximas às iniciais). Esse resultado pode ser justificado pelo tipo de fenômeno de adsorção comentado no parágrafo anterior. Burkert (2003) também o verificou, obtendo razões C*/C₀ no equilíbrio acima de 0,98 para adsorção de glicose e frutose na zeólita Baylith WE 894 trocada com K⁺¹ e Ba⁺², respectivamente. Tal autor objetivava determinar parâmetros cinéticos e de transporte, como constantes cinéticas e difusividade efetiva, concluindo que aqueles dados não eram adequados.

Neste trabalho, a etapa de estudo da cinética de adsorção de AC, em diferentes tipos de zeólitas, tem como principal finalidade a seleção da que demonstra maior afinidade por esse composto. Para isso, comparou-se as respectivas curvas de cinética de adsorção, verificando se existe diferença significativa na quantidade de AC adsorvida, no equilíbrio, nas diferentes zeólitas estudadas.

5.1.2 Seleção da zeólita adequada

Apesar da solução padrão de AC ter se mostrado estável a 30°C, optou-se por temperaturas menores. Bersanetti *et al.* (2005) estudaram a cinética de degradação do AC a partir de diversas fontes e relataram que a estabilidade de AC diminui com o aumento da temperatura, independente da fonte, e que as constantes de degradação de AC produzido por fermentação são maiores que aquelas obtidas nos experimentos com soluções padrões, tanto em pH 6,2 quanto em pH 7,0. Os mesmos autores justificaram tal fato, possivelmente, pela presença de alguns componentes, como amônio, no meio fermentativo que aumentam a instabilidade do AC. Como, nos ensaios em coluna de leito fixo, pretende-se trabalhar com AC proveniente de caldo de fermentação, fixou-se a temperatura de trabalho em 15ºC. Na Figura 16, estão ilustradas as curvas cinéticas de adsorção de AC em ZN.



Figura 16: Curva cinética de adsorção de AC em ZN nas diferentes formas catiônicas. C_{AC0} = 250 mg/L; T = 15^oC.

A partir desses resultados, uma queda mais significativa nas concentrações é observada até um tempo de 40 min, havendo pequenas oscilações, provavelmente devido à adsorção/dessorção de água pela zeólita. Logo, adotou-se o tempo de equilíbrio de 40 min (t* = 40 min), já que esse t* também foi observado para a 13X, conforme será relatado adiante.

É possível visualizar que, em relação à ZN, a forma catiônica ZN-Ba se destacou em relação às demais. No tempo t*, houve retenção de 4,1% do AC inicial ($C_{AC}*/C_{AC0} = 0,959$). A quantidade adsorvida de AC, em relação à quantidade de zeólita, foi q* = 0,1749 mg/g. As outras formas catiônicas dessa zeólita apresentaram valores superiores ($C_{AC}*/C_{AC0} > 0,970$). No entanto, essas diferenças são relativamente pequenas, fazendo-se necessária averiguação estatística das

mesmas. Portanto, realizou-se teste de Tukey, ao nível de confiança de 95% ($\alpha = 0,05$), com as médias de C_{AC}*/C_{AC0} no ponto t* = 40 min, conforme Tabela 2.

Zeólita ZN	CAC*/CAC0	
ZN-Ba	0,959 ± 0,022 ^A	
ZN-Ca	$0,970 \pm 0,019$ A	
ZN-Na	$0,973 \pm 0,025$ AB	
ZN-Mg	$0,978 \pm 0,021$ AB	
ZN-K	$0,981 \pm 0,015$ AB	
ZN-Sr	$1,000 \pm 0,020$ ^B	

Tabela 2: Concentração relativa para adsorção de AC em ZN. T = 15°C; t* =40 min.

Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si, pelo teste de Tukey ($\alpha = 0.05$).

De acordo com a Tabela 2, observa-se que ZN-Ba é diferente estatisticamente apenas de ZN-Sr, logo, conclusões quanto à seleção da zeólita em questão não são confiáveis.

Na Figura 17, estão apresentadas as curvas cinéticas de adsorção de AC em 13X, a partir dos quais é possível visualizar que a forma catiônica 13X-Na se destacou em relação às demais. No tempo t*, houve retenção de 17,4% do AC inicial ($C_{AC}*/C_{ACO} = 0,826$), sendo a quantidade adsorvida de AC, em relação à quantidade de zeólita, q* = 0,4927 mg/g.



Figura 17: Curva cinética de adsorção de AC em 13X nas diferentes formas catiônicas. C_{AC0} = 250 mg/L; T = 15^oC.

Esses valores demonstram uma maior eficiência comparada com ZN. Realizou-se teste de Tukey, ao nível de confiança de 95% (α = 0,05), com as médias de C_{AC}*/C_{AC0} no ponto t* = 40 min, conforme Tabela 3.

Zeólita 13X	CAC*/CAC0
13X-Na	0,826 ± 0,026 ^A
13Х -К	0,899 ± 0,025 ^в
13X -Mg	$0,907 \pm 0,015$ BC
13X -Sr	$0,930 \pm 0,030$ BCD
13X -Ba	$0,956 \pm 0,017$ ^{CD}
13X -Ca	$0,975 \pm 0,020$ ^D

Tabela 3: Concentração relativa para adsorção de AC em 13X. T=15^oC; t*=40 min.

Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si, pelo teste de Tukey ($\alpha = 0.05$).

Segundo a Tabela 3, a zeólita 13X-Na se destacou em relação às demais na adsorção de AC, já que a respectiva concentração C_{AC}^*/C_{AC0} em t^{*} = 40 min foi

diferente estatisticamente das outras formas catiônicas da referida zeólita e, portanto, 13X-Na foi utilizada nas etapas seguintes desse trabalho.

5.2 CARACTERIZAÇÃO DIMENSIONAL DO AC

Tendo em vista a ausência de dados na literatura referentes às dimensões da molécula de AC, investigou-se sobre essas informações, para um melhor conhecimento a respeito da passagem do AC pela estrutura microporosa das zeólitas. A partir da fórmula química e possíveis conformações dos isômeros do referido composto, foram estimados os diâmetros da molécula de AC, através do software de cálculo de estrutura eletrônica Gaussian 03 (Frisch *et al.*, 2004). Esse pacote computacional vem sendo utilizado por diversos autores em relação a estruturas moleculares, freqüências vibracionais e potenciais eletrostáticos de substâncias químicas (Yang *et al.*, 2007; Yan *et al.*, 2007; Sarker *et al.*, 2007). As imagens geradas podem ser visualizadas nas Figuras 18 a 20.



Figura 18: Conformação 1 do isômero Z da molécula de AC.



Figura 19: Conformação 2 do isômero Z da molécula de AC.



Legenda das Figuras 18, 19 e 20: C ● H O ● N ●

A partir desses dados, o diâmetro médio do AC foi estimado em 10,2 Å, considerando as conformações acima. O software também fornece um valor energético adimensional, sem sentido físico-químico, porém útil para uma análise referencial. Esses valores foram de -2,227.10⁻³, -2,261.10⁻³ e -2,228.10⁻³ para a conformação 1 do isômero Z, conformação 2 do isômero Z e isômero E, respectivamente, sugerindo uma maior estabilidade para o segundo composto. Logo, o diâmetro médio da molécula de AC estimado foi D_{AC} = 9,6 Å.

5.3 CARACTERIZAÇÃO DA ZEÓLITA 13X-Na

5.3.1 Composição e densidade

Na Tabela 4, são apresentados os valores obtidos para a composição da zeólita 13X-Na.

Componente	Teor (%)	Componente	Teor (%)	
SiO ₂	42,00	K ₂ O	0,22	
Al ₂ O ₃	24,70	P_2O_5	0,12	
Na ₂ O	13,56	TiO ₂	0,12	
MgO	1,84	MnO	0,01	
Fe ₂ O ₃	0,70	Umidade	16,10	
CaO	0,63	-	-	

Tabela 4: Composição da zeólita 13X-Na.

Si/Al = 1,5.

Esses dados demonstram composição característica de zeólitas do tipo NaX, tendo em vista que o óxido majoritário foi o Na2O (78,84% em relação aos demais, com exceção de SiO₂ e Al₂O₃) e a relação Si/Al de 1,5 (Braga e Morgon, 2007; Oliveira *et al.*, 2001).

A densidade calculada foi $d_z = 2,248 \text{ g/cm}^3$.

5.3.2 Área superficial e estrutura porosa

Nas Figuras 21 e 22, estão ilustradas a isoterma de adsorção de nitrogênio a 77 K e a curva BET linear, respectivamente. Na Tabela 5, estão apresentadas as propriedades calculadas.



Figura 21: Isoterma de adsorção de nitrogênio a 77 K em 13X-Na.

Figura 22: Ajuste da curva BET para 13X-Na (R² = 0,9949).

Tabela 5: Área superficial específica (SBET), volume de microporos (V_{micro}), volume total de poros (V_{poros}) e diâmetro médio de poros (D_{poros}) de 13X-Na.

Propriedade	Valor		
Sbet	444,860 m²/g		
Vmicro	0,203 cm³/g		
V_{poros}	0,308 cm ³ /g		
D _{poros}	28 Å		

Conhecendo-se a densidade da zeólita (d_z) e o volume total ocupado pelos poros (V_{poros}), calculou-se a porosidade da partícula (ϵ_p):

$$\mathcal{E}_{p} = V_{poros} d_{z} \left[\frac{cm_{poros}^{3}}{g_{z}} \cdot \frac{g_{z}}{cm_{z}^{3}} = \frac{cm_{poros}^{3}}{cm_{z}^{3}} \right]$$
Eq. 23

 ${\cal E}_p = 0,69$

Na Tabela 6, pode ser observada uma comparação das propriedades calculadas com as encontradas na literatura para diferentes tipos de zeólitas.

Referência	Zeólita	S _{вет} (m²/g)	dz (g/cm³)	V _{poros} (cm³/g)	ε _p
Chang <i>et al.</i> (2006)	Y	825	nd	0,260	nd
Burkert (2003)	Y	448	1,97	0,221	0,43
Yu et al. (1998)	Х	400	1,30	nd	nd
Huang <i>et al.</i> (1995)	А	800	1,30	nd	nd
Este trabalho	Х	445	2,25	0,308	0,69

Tabela 6: Propriedades físico-estruturais: comparação com a literatura.

nd: não determinado.

A zeólita em questão apresentou área superficial específica similar a da zeólita Y estudada por Burkert (2003) e da NaX utilizada por Yu *et al.* (1998).

Os resultados comprovam o caráter microporoso de 13X-Na, apresentando uma porosidade de partícula (ϵ_p) 1,6 vezes maior que a da zeólita Y estudada por Burkert (2003). A porcentagem de V_{micro} em relação a V_{poros} foi de 66%, demonstrando que mais da metade dos poros têm diâmetros menores que 20 Å (Claudino, 2003), favorecendo o fenômeno de peneiramento molecular com o impedimento da passagem de moléculas maiores pelos microporos, como carboidratos, proteínas e peptídeos de cadeias longas.

Zeólitas dos tipos NaY e NaX apresentam supercavidade α com diâmetros da ordem de 8 e 13 Å, respectivamente (Weber *et al.*, 2008; Oliveira *et al.*, 2001; Serralha *et al.*, 1998). No entanto, Chang et al. (2006) estudando sobre imobilização de lisozima (uma proteína esférica de dimensões 30 x 30 x 45 Å), utilizaram zeólita NaY da Strem Chemicals Inc. (Newburyport, MA) com 21 Å de diâmetro médio. A

determinação do diâmetro médio pelo método BJH baseia-se na equação de Kelvin e assume o esvaziamento progressivo dos poros cheios de líquido com o decréscimo da pressão (Claudino, 2003). Assim, como o próprio nome revela, trata-se de uma média que incorpora todos os poros (externos e microporos) do sólido. Por esta razão, 13X-Na apresentou $D_{poros} = 28$ Å.

5.3.3 Morfologia superficial

Imagens da morfologia e topografia da estrutura microcristalina de 13X-Na foram obtidas através de MEV. Na Figura 23, a microfotografia de uma partícula com diâmetro de aproximadamente 210 µm aumentada 400 vezes. Nas Figuras 24, 25 e 26, a mesma partícula microfotografada com aumento de 2000, 5000 e 5500 vezes, respectivamente.



Figura 23: Microscopia eletrônica de varredura (x 400) de zeólita 13X-Na.



Figura 24: Microscopia eletrônica de varredura (x 2000) de zeólita 13X-Na.



Figura 25: Microscopia eletrônica de varredura (x 5000) de zeólita 13X-Na.



Figura 26: Microscopia eletrônica de varredura (x 5500) de zeólita 13X-Na.

Através dessas ilustrações, é possível visualizar a estruturação a partir de microcristais (cristalitos) de formato esférico, com diâmetro de 2 μ m aproximadamente. Conforme relatado por Serralha *et al.* (1998), zeólitas do tipo NaX, NaY e NaA são constituídas por cristalitos de 2 μ m, 1 - 2 μ m e 0,5 - 1 μ m, respectivamente (Breck, 1974).

Observa-se os microinterstícios (poros externos), que atuam como interfaces entre fases aquosas e meios orgânicos contendo substratos, interessantes na retenção e/ou adsorção de diversas substâncias. Esses espaços podem ser preenchidos com compostos de diâmetro superior ao das aberturas dos poros. Alguns autores descrevem esses adsorventes como suportes em hidrólises enzimáticas catalisadas por cutinase (Serralha *et al.*, 2002; Serralha *et al.*, 2000; Serralha *et al.*, 1998), lipase (Knezevic *et al.*, 1998; Lie e Molin, 1991), tirosinase (Seetharam e Saville, 2002) e lisozima (Chang *et al.*, 2006), supostamente alocados nos vacúolos intercristalinos.

Todos esses resultados revelam a vasta área de contato que a zeólita apresenta, demonstrando a capacidade de retenção de diversos componentes a partir de soluções complexas, como o AC em caldo de fermentação por exemplo,
seja ela de caráter iônico (com a interação com sítios ocupados pelos cátions de compensação) e/ou físico.

Logo, a zeólita em estudo apresenta características micro e nanoestruturais favoráveis à adsorção de AC, seja através das cavidades intracristalinas ou pelos espaços microintersticiais.

5.4 POROSIDADE DO LEITO DE PARTÍCULAS

Inicialmente, realizou-se ensaios com a finalidade de definição do intervalo de vazões em que há diferença entre os primeiros momentos (tempos de retenção médios) do traçador no sistema com (CZ) e sem zeólitas (SZ). Em faixas de vazões relativamente elevadas, essa diferença é anulada com o aumento da velocidade superficial do traçador pelo leito havendo, com isso, a perda do caráter linear da relação explicada pela Equação 13, conforme Figura 27.



Figura 27: Primeiro momento de blue dextran para diferentes vazões no leito: com zeólita 13X-Na (CZ) e sem zeólita (SZ).

Observa-se que, em vazões acima de 1,50 mL/min, os primeiros momentos do traçador nos sistemas CZ e SZ coincidem, portanto, foram obtidos os perfis de eluição da blue dextran, nas vazões 0,25, 0,50, 1,00 e 1,50 mL/min.

Os resultados dessas injeções, realizadas em duplicata para cada sistema (CZ e SZ), estão apresentados na Tabela 7. Os perfis de eluição de blue dextran nas diferentes vazões e o ajuste dos dados à reta (Equação 13), para o cálculo da porosidade do leito (ε_b), estão ilustrados nas Figuras 28 a 32, respectivamente.

v (mL/min)	μ ^{cz} (min)	μ ^{sz} (min)	μ^{L} (min)
0,25	9,96 ± 0,25	$7,70 \pm 0,01$	2,26
0,50	$5,23 \pm 0,01$	$4,05 \pm 0,02$	1,18
1,00	$2,35 \pm 0,05$	$2,09 \pm 0,02$	0,26
1,50	$1,41 \pm 0,02$	$1,36 \pm 0,01$	0,04

Tabela 7: Primeiro momento de blue dextran para cada vazão: com zeólita 13X-Na (μ^{CZ}), sem zeólita (μ^{SZ}) e do leito (diferença) (μ^{L}).



Figura 28: Perfis de eluição de blue dextran Figura 29: Perfis de eluição de blue dextran na vazão 0,25 mL/min.

na vazão 0,50 mL/min.



na vazão 1,00 mL/min.

Figura 30: Perfis de eluição de blue dextran Figura 31: Perfis de eluição de blue dextran na vazão 1,50 mL/min.



Figura 32: Primeiro momento do leito para diferentes velocidades superficiais (R²=0,985).

Com a plotação dos primeiros momentos pelos respectivos valores de L/vo, é possível apreciar a porosidade do leito de partículas:

$$\mu^{L} = \varepsilon_{b} \frac{L}{v_{0}} - \frac{t_{0}}{2} = 0,8523 \frac{L}{v_{0}} - 0,3486$$

 $\mathcal{E}_b \cong 0,85$

Portanto, o valor estimado para a porosidade de leito de zeólitas 13X-Na na granulometria 0,053 - 0,062 mm foi ε_b = 0,85. Burkert (2003) observou uma porosidade de 0,58 para zeólita Y, porém numa faixa de granulometria mais ampla (0,053 - 0,125 mm). Na Tabela 8, uma comparação da porosidade do leito com as encontradas na literatura.

Referência	Zeólita	Sвет (m²/g)	dz (g/cm ³)	Granulometria (mm)	Eb
Burkert (2003)	Y	448	1,97	0,053-0,125	0,58
Yu et al. (1998)	Х	400	1,30	nd	0,35
Huang <i>et al.</i> (1995)	А	800	1,30	nd	0,35
Este trabalho	Х	445	2,25	0,053-0,062	0,85

 Tabela 8:
 Porosidade do leito de partículas: comparação com a literatura.

nd: não determinado.

Duas hipóteses são sugeridas para essas diferenças:

Hipótese 1: como d^z da presente zeólita é maior que as citadas, é possível que exista um maior número de partículas no respectivo leito, e assim, um maior número de espaços intersticiais. Porém, para essa hipótese, é necessário levar em consideração a densidade, constituição e estruturação molecular das partículas das respectivas zeólitas, o que conferiria alto grau de complexicidade para essa análise.

Hipótese 2: Segundo Hirschhorn (1969), a mistura de partículas de diferentes tamanhos pode aumentar a densidade aparente (d_A), porém se as partículas de menor tamanho estão em grande quantidade estas podem provocar uma queda em d_A , e conseqüente aumento na porosidade, sabendo que:

$$\mathcal{E}_{b} = 1 - FE = 1 - d_{A} = 1 - \frac{V_{ocupado}}{V_{estrutura}}$$
Eq. 24

Onde: FE = fator de empacotamento.

Como podemos observar na Figura 34, a densidade aparente diminui com o decréscimo do tamanho das partículas.



5.2 (3200) Alsued Head of the second second

Figura 33: Interstícios preenchidos com esferas de menor tamanho (Hirschhorn, 1969).

Figura 34: Efeito na densidade aparente da adição de finas partículas (-325 mesh, menor que 0,044 mm) esféricas a uma distribuição (-100, +150 mesh) de partículas de aço inox (Hirschhorn, 1969).

Essas informações podem justificar o valor estimado no presente trabalho para a porosidade do leito de partículas, tendo em vista que foram utilizadas zeólitas em um intervalo granulométrico comparativamente pequeno.

5.5 OBTENÇÃO DE SOLUÇÕES DE AC PURO

Essa etapa foi adicionada ao projeto inicial devido à necessidade de uma solução com grau de pureza confiável para construção das isotermas de adsorção. Almeida (2003), estudando a influência da fonte de AC na adsorção, verificou uma diminuição de 15% na adsorção com uso de AC a partir de Clavulin[®], quando comparado com ensaios, nas mesmas condições, porém com uso de AC puro.

No entanto, devido à inviabilidade econômica bem como dificuldades de transporte, levando-se em consideração a alta instabilidade, na aquisição desse componente puro, optou-se pela obtenção de soluções de AC puro a partir de HPLC em escala semi-preparativa.

Os dados obtidos foram satisfatórios, havendo uma boa separação entre os componentes (AC e AM) do padrão usado (Clavulin®). Um volume de 2,25 mL de solução na concentração de 12,5 g/L foi injetado. As frações do pico correspondente ao AC foram coletadas e armazenadas em freezer (aproximadamente -10°C) e pH 6,2. Essas soluções apresentaram concentrações de até 1,2 g/L.

Em um período de 7 dias, observou-se uma queda de aproximadamente 80% da concentração de AC puro. Tal fenômeno pode ser explicado pela remoção de componentes estabilizantes presentes no padrão original. Esse fato comprova a necessidade de armazenamento em temperaturas abaixo de -50°C, na qual a atividade de água é anulada, evitando o ataque de íons H⁺ e OH⁻ à molécula de AC. Assim, um estudo a respeito da identificação e quantificação de compostos que colaborem na estabilidade dessas soluções torna-se necessário.

5.6 ISOTERMAS DE ADSORÇÃO DE AC

Devido à baixa estabilidade do AC, determinou-se as isotermas de adsorção nas temperaturas de 10, 15 e 20ºC. O fenômeno de adsorção foi avaliado de acordo com os modelos Linear, Langmuir e Freundlinch. Os dados dos ajustes para cada modelo são mostrados nas Tabelas 9 a 11.

Modelo Linear	T (ºC)	k (x10 ³) (L/g)	R ²
	10	1,272	0,823
$q^* = k.C^*$	15	1,182	0,520
	20	0,903	0,965

Tabela 9: Parâmetros do modelo Linear para adsorção de AC em 13X-Na.

Tabela 10: Parâmetros do modelo Langmuir para adsorção de AC em 13X-Na.

Modelo Langmuir	T (ºC)	q _m (mg/g)	k D (mg/L)	R ²
a C*	10	0,351	154,153	0,946
$q^* = \frac{q_m \cdot C}{k_p + C^*}$	15	0,219	90,390	0,883
D	20	0,314	235,159	0,990

Tabela 11: Parâmetros do modelo Freundlinch para adsorção de AC em 13X-Na.

Modelo Freundlinch	T (ºC)	kf (x103)	nF	R ²
	10	6,562	0,655	0,933
$q^* = k_F \cdot (C^*)^{n_F}$	15	7,428	0,592	0,828
	20	2,693	0,767	0,993

De acordo com os valores dos coeficientes de correlação (R²), o modelo Langmuir foi o que melhor descreveu, nos intervalos de temperaturas e concentrações avaliadas, o processo de adsorção de AC em 13X-Na.

As regressões não-lineares dos dados experimentais das isotermas de adsorção de AC em 13X-Na segundo o modelo Langmuir a 10, 15 e 20ºC estão ilustradas nas Figuras 35 a 37, respectivamente.



Figura 35: Regressão não-linear dos dados experimentais da isoterma de adsorção de AC puro em 13X-Na a 10ºC, segundo modelo de Langmuir (R² = 0,946).



Figura 36: Regressão não-linear dos dados experimentais da isoterma de adsorção de AC puro em 13X-Na a 15ºC, segundo modelo de Langmuir (R² = 0,883).



Figura 37: Regressão não-linear dos dados experimentais da isoterma de adsorção de AC puro em 13X-Na a 20ºC, segundo modelo de Langmuir (R² = 0,990).

Com a finalidade de se obter maior confiabilidade em conclusões a respeito do efeito da temperatura (através dos parâmetros) da adsorção de AC na zeólita em estudo, o referido processo foi avaliado tendo em vista os erros padrões das regressões citadas, conforme Figuras 38 e 39.







Figura 39: Avaliação estatística da constante de dissociação (kd) de AC em 13X-Na a diferentes temperaturas.

A partir dessa análise, nota-se que as diferenças entre os valores dos parâmetros do modelo Langmuir não foram estatisticamente significativas, nos intervalos de temperaturas e concentrações estudados.

Geralmente, a energia de ativação difusional em matrizes de troca iônica é maior quando comparada com as de outros suportes, ou seja, a temperatura influencia mais pronunciadamente naquele processo do que nos que usam outros adsorventes (Mayer *et al.*, 1997).

Alguns autores consideram que, para sistemas com baixas concentrações de adsorbato ou onde a fase estacionária mostra baixa afinidade pelo mesmo, o equilíbrio de adsorção pode ser descrito pelo modelo Linear (Mayer e Deckwer, 1996b).

Avaliou-se, então, o coeficiente de partição do modelo Linear (k) e a constante do modelo Freundlinch (k_F) a diferentes temperaturas, observando-se os erros padrões, conforme Figuras 40 e 41.



Figura 40: Avaliação estatística do coeficiente de partição (k) de AC em 13X-Na a diferentes temperaturas.





Como resultado do aumento de temperatura, observou-se diminuição no coeficiente de partição (ou constante de adsorção, k) assim como na constante k_F.

Barboza *et al.* (2003), investigando sobre a influência da temperatura na cinética de adsorção e dessorção de AC em resinas de troca iônica, relataram um aumento nos valores de k_D (constante de dissociação) conseqüente do acréscimo na temperatura, justificando tal fato pelo aumento na freqüência de choques moleculares entre os grupo iônicos do AC com os sítios carregados da resina, resultando numa dessorção mais pronunciada. Mayer *et al.*, (1997), utilizando resinas de troca iônica XAD4 e IRA400 na adsorção de AC, constataram que, para ambas, o aumento de temperatura de 4 para 21°C causou diminuição nos respectivos valores do coeficiente de difusão efetiva. Chang *et al.* (2006) realizaram estudo de imobilização de lisozima em zeólitas NaY no intervalo entre 4 e 37°C e verificaram, paralelarmente ao acréscimo na temperatura, uma queda na quantidade máxima de adsorção (q_m) e aumento na constante de dissociação (k_D).

Logo, nas condições estudadas, o aumento da temperatura desfavoreceu o processo de adsorção de AC em 13X-Na, devido ao evidenciamento no processo inverso, de dessorção, concordando com dados encontrados na literatura.

5.7 ENSAIOS EM COLUNA DE LEITO FIXO

Como citado anteriormente, para essa etapa, utilizou-se caldo de fermentação contendo AC, disponibilizado (centrifugado e microfiltrado) pelo Laboratório de Engenharia Bioquímica/DEQ/UFSCar. O caldo foi homogeneamente distribuído em lotes de 5 mL e armazenado em ultafreezer na temperatura de -75°C e pH 6,2. Determinou-se a concentração de AC segundo Bird *et al.* (1982): 853,330 mg/L.

A metodologia utilizada foi a de pulso cromatográfico, injetando-se um pulso 2 mL na corrente de eluente, difundindo numa coluna encamisada com 1 cm

de diâmetro interno e altura de leito de 50 cm, contendo a zeólita 13X-Na, com controle de temperatura e vazão (15ºC e 0,13 mL/min, respectivamente).

Realizaram-se ao todo oito injeções: I1, I2, I3, I4, I5, I6, I7 e I8, sendo as três primeiras (I1 a I3) em caráter preliminar, com a finalidade de adaptação da metodologia bem como solução de problemas com entupimento da coluna, as quais não apresentaram dados concisos e, por esta razão, não serão relatadas no presente documento. Esses entupimentos se deram devido à alta porcentagem de finos nas frações das zeólitas utilizadas, já que as mesmas abrangiam um intervalo granulométrico relativamente amplo. Optou-se, então, por uma granulometria mais homogênea e pela adição de uma operação de "lavagem" do material com o intuito de separar as partículas excessivamente finas, o que solucionou o referido problema.

Avaliou-se a separação de AC em relação às proteínas totais das amostras: qualitativamente, a partir da leitura direta das absorbâncias (Abs) em espectrofotômetro a 280 nm; quantitativamente (com determinação do teor de proteínas totais segundo Lowry *et al.* (1951), através da eficiência de separação (ES, que considera todos os pontos correspondentes aos picos de cada componente) e a partir de uma análise pontual dos pontos de maior concentração (topo dos picos) com o fator de concentração (FC) e fator de purificação referente às proteínas (FPP) (Equações 15 a 21). O balanço de massa, de AC e proteínas, foi levado em consideração.

A separação de AC também foi investigada em relação aos contaminantes totais por cromatografia (HPLC), através da porcentagem de área do pico correspondente ao AC das amostras coletadas na saída da coluna de zeólitas em relação à mesma porcentagem da amostra inicial do caldo de fermentação (FPC) (Equação 22).

As condições operacionais dos ensaios I4 a I8 são mostradas na Tabela 12.

F	v	Т	\mathbf{V}_{inj}	Δt	Granulometria	Elt.
Ensaio	(mL/min)	(°C)	(mL)	(min)	(mm)	Eluente
I4	0,13	15	2,0	20	0,062 - 0,088	TF
I5	0,13	15	2,0	20	0,053 - 0,062	TF
I6	0,13	15	2,0	20	0,053 - 0,062	AD
I7	0,13	15	2,0	10	0,053 - 0,062	AD
I8	0,13	15	2,0	10	0,053 - 0,062	TF

Tabela 12: Condições operacionais dos ensaios em coluna de leito fixo de 13X-Na.

Onde:

v = vazão de alimentação;

T = temperatura;

V_{inj} = volume de amostra injetada;

 Δt = intervalo de amostragem;

TF = tampão fosfato (0,2 M e pH 6,2);

AD = água destilada.

5.7.1 Separação de AC referente às proteínas

Nesta seção, serão detalhados os ensaios I4, I5 e I6. Os valores correspondentes às absorbâncias (Abs) a 280 nm e ao pH tal como os perfis cromatográficos, do AC e das proteínas, das amostras coletadas na saída da coluna de zeólitas 13X-Na no ensaio I4, estão apresentados nas Figuras 42 e 43.



Figura 42: Ensaio I4. Perfil cromatográfico de AC, absorbâncias (Abs) a 280 nm e pH das amostras coletadas na saída da coluna de 13X-Na.



Figura 43: Ensaio I4. Separação de AC e proteínas em coluna de 13X-Na.

Os primeiros momentos (tempos de retenção médios) do AC e das proteínas foram: μ_{AC} = 206 min e μ_P = 211 min, respectivamente.

Calculou-se, para o ponto de maior C_{AC}, o fator de concentração do AC (FC) e fator de purificação referente às proteínas (FPP): FC = 0,42 e FPP = 1,10.

Para análise geral da separação, calculou-se a eficiência de separação: ES = 0,33. Os percentuais de massa recuperada de AC e proteínas foram apreciados através de balanço de massa: $MR_{AC} = 92,4\%$ e $MR_P = 100,0\%$, respectivamente.

Uma discussão comparativa entre os ensaios relatados na presente seção será desenvolvida ao final da mesma.

A seguir, os resultados correspondentes ao ensaio I5. O mesmo foi efetuado nas mesmas condições de I4, porém com partículas mais finas (0,053 - 0,062 mm), com a finalidade de se observar possíveis diferenças nos parâmetros aqui avaliados. Os valores correspondentes às absorbâncias (Abs) a 280 nm e ao pH tal como os perfis cromatográficos, do AC e das proteínas, das amostras coletadas na saída da coluna de zeólitas 13X-Na no ensaio I5, estão apresentados nas Figuras 44 e 45.



Figura 44: Ensaio I5. Perfil cromatográfico de AC, absorbâncias (Abs) a 280 nm e pH das amostras coletadas na saída da coluna de 13X-Na.



Figura 45: Ensaio I5. Separação de AC e proteínas em coluna de 13X-Na.

Os primeiros momentos do AC e das proteínas foram: μ_{AC} = 207 min e μ_P = 213 min, respectivamente.

O fator de concentração do AC (FC) e fator de purificação referente às proteínas (FPP) calculados foram: FC = 0,40 e FPP = 1,25.

Para análise geral da separação, calculou-se a eficiência de separação: ES = 0,38.

Os percentuais de massa recuperada de AC e proteínas estimados foram: MR_{AC} = 100,0% e MR_P =100,0%, respectivamente.

O ensaio I6 foi desenvolvido nas mesmas condições de I5, porém, com água destilada como eluente. A mesma análise foi realizada, conforme Figuras 46 e 47.



Figura 46: Ensaio I6. Perfil cromatográfico de AC, absorbâncias (Abs) a 280 nm e pH das amostras coletadas na saída da coluna de 13X-Na.



Figura 47: Ensaio I6. Separação de AC e proteínas em coluna de 13X-Na.

Os primeiros momentos do AC e das proteínas foram: μ_{AC} = 216 min e μ_P = 221 min, respectivamente.

O fator de concentração do AC (FC) e fator de purificação referente às proteínas (FPP) calculados foram: FC = 0,24 e FPP = 0,64.

Para análise geral da separação, calculou-se a eficiência de separação: ES = 0,24. Os percentuais de massa recuperada de AC e proteínas estimados foram: $MR_{AC} = 64,6\%$ e $MR_P = 100,0\%$, respectivamente.

Em todos os experimentos, o pH ficou estável: aproximadamente 7,2, em I4 e I5 (TF como eluente) e 9,5 em I6 (AD como eluente). Uma discreta queda no referido valor foi observada em I6 nos pontos correspondentes à saída das frações do caldo, já que o mesmo foi injeto em pH 6,2. Apesar da alimentação ter sido feita com tampão, pH 6,2, e água, pH aproximadamente 6,5, observou-se um aumento nesses valores nas frações coletadas na saída da coluna de zeólitas. Esse fenômeno pode ser explicado 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). No presente caso, a zeólita usada, quando em solução aquosa, apresenta pH básico (aproximadamente 10,0), comportando-se como uma resina aniônica, onde prótons são atraídos do micro ambiente, havendo, provavelmente por esta razão, um aumento nas unidades de pH observados na saída da referida coluna.

Em relação à quantidade injetada, observou-se uma total recuperação de massa das proteínas em todos os ensaios.

A partir da Tabela 13, é possível realizar uma análise comparativa dos parâmetros utilizados para avaliação da separação de AC e proteínas provenientes do caldo de fermentação.

Encoio	μас	μ_P	Δμ	μ FC	FPP	EDD EC	ЕС	MRAC
Ensalo	(min)	(min)	(min)			E3	(%)	
I4	206	211	5	0,42	1,10	0,33	92,4	
I5	207	213	6	0,40	1,25	0,38	100,0	
I6	216	221	5	0,24	0,64	0,24	64,6	

Tabela 13: Avaliação da separação em coluna de 13X-Na de AC e proteínas nos ensaios I4, I5 e I6.

As condições aplicadas em I6 mostraram-se inadequadas para esse tipo de experimento, tendo em vista os baixos valores dos critérios observados. Houve perda de 35,4% do AC injetado, devido à degradação do mesmo com o alto valor do pH. Tal resultado evidencia a alta hidrólise do AC quando em soluções em condições de pH abaixo de 4,5 e acima de 7,5. Alguns autores verificaram que a degradação de AC, a 20°C, ocorre mais rapidamente em soluções básicas que em ácidas (Bersanetti *et al.*, 2000).

Fica bem evidenciado o destaque do ensaio I5 em relação aos parâmetros investigados quando comparado com I4. I5 apresentou um FC 5% menor, porém, um FPP e uma ES, ambos, 15% maiores, além de aproximadamente 100% de recuperação do AC injetado. Logo, entre as condições testadas no presente trabalho, as de I5 foram as mais satisfatórias para separação de AC e proteínas totais provenientes de processo fermentativo.

É importante enfatizar que, em todos os experimentos realizados, observou-se uma queda mais suave nas concentrações de proteínas, havendo um "espalhamento" do pico desses componentes. Tendo em conta que foi usado um método genérico de proteínas (proteínas de Lowry), é possível que haja uma

separação mais pronunciada do AC em relação a alguns aminoácidos e/ou peptídeos específicos.

Convém ressaltar que, nos ensaios aqui realizados, manteve-se os parâmetros operacionais (v, T, V_{inj}, número de colunas em série) constantes, levando em consideração a inexistência de dados referentes à separação de AC pelo adsorvente em estudo a partir da metodologia utilizada. No entanto, tais variáveis constituem fatores intrínsecos nos processos de separação de biomoléculas a partir de colunas de adsorção, mais especificamente de zeólitas.

Burkert (2003) realizou um estudo sobre a influência de algumas variáveis do processo cromatográfico sobre a ES de sistemas glicose/frutose e dextrana/frutose em coluna de zeólitas Baylith WE 894, através de fator de sensibilidade por ele definido. Esse autor concluiu que acréscimos na temperatura e na concentração da amostra injetada influenciaram positivamente, enquanto que aumentos no volume do pulso injetado e na vazão de alimentação (em termos de velocidade superficial) demonstraram influência negativa.

Lorenço (2004) avaliou a separação de frutose e glicose, usando a mesma zeólita citada no parágrafo anterior, alterando a vazão de alimentação e adicionando colunas em série, conforme Tabela 14.

Tabela 14: Eficiência de separação (ES) de frutose e glicose: influência da vazão de alimentação (v) e adição de colunas em série (Lorenço, 2004).

Número de	v	ЕС	Número de	V	ЕС
colunas em série	(mL/min)	E9	colunas em série	(mL/min)	E9
1	0,10	0,49	3	0,15	1,11
1	0,20	0,32	3	0,20	1,04
2	0,10	0,97	-	-	-
3	0,10	1,24	-	-	-

Esses dados mostram a evolução nos resultados obtidos para ES com a variação dos parâmetros operacionais do referido processo.

Desta maneira, a separação de AC e proteínas totais avaliada no presente trabalho pode ser considerada satisfatória para um estudo preliminar. A metodologia utilizada demonstra-se promissora na referida separação, com a averiguação mais detalhada e, conseqüentemente, otimização dos parâmetros operacionais tal como adição de colunas em série.

5.7.2 Separação de AC referente aos contaminantes

Os ensaios I7 e I8 foram desenvolvidos com a finalidade de se observar a purificação do AC em relação aos contaminantes do caldo fermentativo. Utilizou-se como critério de purificação o fator de purificação referente aos contaminantes (FPC), definido anteriormente. O balanço de massa de AC também foi levado em consideração.

I7 foi realizado nas mesmas condições de I6 (AD como eluente), e I8 nas mesmas condições de I5 (TF como eluente). Optou-se também, nessas injeções, um intervalo de amostragem menor ($\Delta t = 10 \text{ min}$), para uma melhor visualização do processo.

Outra particularidade dos referidos ensaios foi o método de quantificação de AC que, nesse caso específico, foi realizada por HPLC através da metodologia desenvolvida por Foulstone e Reading (1982) e adaptada por Gouveia *et al.* (1999).

Os resultados dos testes podem ser observados nas Figuras 48, 49 e Tabelas 15 e 16.



Figura 48: Ensaio I7. Concentrações de AC na saída da coluna de 13X-Na, AD como eluente.



Figura 49: Ensaio I8. Concentrações de AC na saída da coluna de 13X-Na, TF como eluente.

Tabela 15: Porcentagens de área, fator de purificação referente aos contaminantes
(FPC) e fator de concentração (FC) do ensaio I7.

Tempo (min)	A _{AC} (%)	A^P_{AC} (%)	FPC	FC
0	53,97	-	-	-
180	-	51,07	0,95	0,04
190	-	61,26	1,14	0,16
200	-	58,90	1,10	0,34
210	-	53,38	0,99	0,27
220	-	42,05	0,78	0,13
230	-	33,15	0,61	0,06
240	-	23,57	0,44	0,03

Tempo (min)	$A_{\scriptscriptstyle AC}$ (%)	$A^{\scriptscriptstyle P}_{\scriptscriptstyle AC}$ (%)	FPC	FC
0	53,64	-	-	-
180	-	85,62	1,60	0,04
190	-	71,36	1,33	0,23
200	-	67,68	1,26	0,45
210	-	64,41	1,20	0,39
220	-	57,26	1,07	0,20
230	-	54,68	1,02	0,07
240	-	43,05	0,80	0,02

Tabela 16: Porcentagens de área, fator de purificação referente aos contaminantes (FPC) e fator de concentração (FC) do ensaio I8.

Para efeito comparativo, calculou-se a média dos respectivos fatores correspondentes aos tempos 190, 200 e 210 min, conforme Tabela 17. Através do balanço de massa efetuado, os percentuais de massa recuperada de AC (MR_{AC}) foram apreciados, esses valores encontram-se na Tabela 17.

Tabela 17: Comparação do fator de purificação referente aos contaminantes médio (FPC_{Médio}), fator de concentração médio (FC_{Médio}) e percentuais de massa recuperada de AC (MR_{AC}) dos ensaios I7 e I8.

Ensaio	FPC Médio	FCMédio	MRAC
I7	1,08	0,26	69,6
18	1,28	0,37	94,8

É importante relembrar que I5 e I8 foram realizados nas mesmas condições (exceto o intervalo de amostragem), e que I6 e I7 foram realizados nas mesmas condições (exceto o intervalo de amostragem). Esses resultados concordam com os encontrados nos ensaios I5 e I6, reforçando que a utilização de água como eluente torna o processo inadequado, levando em consideração os baixos FPC e FC bem como a perda de 30,4% do AC injetado, decorrente da degradação do mesmo frente ao pH básico.

6 CONCLUSÕES

 Dois tipos distintos de zeólitas, ambas em seis diferentes formas catiônicas, foram testadas quanto à adsorção de AC. A zeólita sintética do tipo faujasita NaX na forma sódica (13X-Na) se destacou dentre as demais e foi a empregada nas etapas subseqüentes.

• A zeólita 13X-Na demonstrou capacidade superficial e microporosa adequada à adsorção de AC, de acordo com o estudo dimensional da molécula de AC e caracterização da zeólita selecionada.

• Em relação à porosidade, o leito de 13X-Na apresentou um valor relativamente alto, devido à remoção de partículas finas com a lavagem da mesma. Deste modo, são necessárias investigações mais detalhadas para uma melhor definição desse parâmetro.

• A partir do desenvolvimento de um sistema cromatográfico em escala semi-preparativa foi possível a obtenção de soluções de AC puro. Porém, as mesmas mostraram-se altamente sensíveis à temperatura, devido à separação de componentes estabilizantes presentes no padrão original. Estudos para um melhor conhecimento da hidrólise assim como uma identificação e quantificação de compostos que colaborem na estabilidade dessas soluções tornam-se necessários.

• Conforme os estudos de equilíbrio da adsorção de AC puro na zeólita selecionada, obteve-se as isotermas de adsorção de AC em 13X-Na. O modelo que melhor representou esse fenômeno foi o Langmuir. Embora os parâmetros do modelo citado não terem demonstrado um comportamento com tendência bem definida, verificou-se que o processo é desfavorecido pelo aumento da temperatura, a partir de uma análise global incluindo os parâmetros dos outros

modelos testados (Linear e Freundlinch). Sugere-se a pesquisa desse comportamento em intervalos de temperatura e concentrações mais amplos.

• A separação de AC proveniente de caldo de fermentação em coluna de leito fixo de 13X-Na, em relação às proteínas totais bem com aos contaminantes definidos, foi considerada satisfatória para uma averiguação preliminar, demonstrando-se promissora em relação à eficiência de separação em trabalhos futuros, com adição de colunas em série, otimização dos parâmetros operacionais – tais como temperatura, volume de injeção, vazão da alimentação – e melhor definição de contaminantes.

7 LITERATURA CITADA

- AHMED, S.; CHUGHTAI, S.; KEANE, M. A. The removal of cadminum and lead from aqueous solution by ion exchange with Na Y zeolite. **Sep. Purif. Technol.**, v. 13, p. 57-64, 1998.
- 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.
- ARNOLD, F. H.; BLANCH, H. W.; WILKE, C. R. Liquid chromatography plate height equations. J. Chromatogr., v. 330, p. 159-166, 1985.
- 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. **Biochemical Engineering Journal**, v. 14, p. 19-26, 2003.
- BELTER, P. A.; CUSSLER, E. L.; HU, W. S. Bioseparations: downsteram processing for biotechnology. New York: J. Wiley, 1988.
- 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.
- 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.; ALMEIDA, R. M. R. G.; BARBOZA, M.; ARAUJO, M. L. G. C.; HOKKA, C. O. Kinetics studies on clavulanic acid degradation. Biochemical Engineering Journal, 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.
- BRAGA, A. A. C.; MORGON, N. H. Descrição estruturais cristalinas de zeólitos. **Quím. Nova,** v. 30, p. 178-188, 2007.
- BRECK, D. W. Zeolite Molecular Sieves. New York: Wiley, 1974.
- 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. Natturally ocurring β-lactam inhibitors with antibacterial activity. The Journal of Antibiotics, 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, Byosynthesis and Fermentation. In: VANDAMME, E. J. Biotechnology of Industrial Antibiotics. New York: Marcel Dekker, Inc., 1984. p. 225-235.
- BUYNAC, J. D. Understanding the longevity of the β-lactam antibiotics and of antibiotic/ β-lactamase inhibitor combinations. Biochemical Pharmacology, v. 71, p. 930-940, 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. **Biochemical Engineering Journal,** v. 28, p. 1-9, 2006.
- CHARNAS, R. L.; FISHER, J.; KNOWLES, J. R. Chemical studies on the inactivation of *Escherichia coli* RTEM β-lactamase by clavulanic acid. **Biochemistry**, v. 17, p. 2185-2189, 1978.
- CIOLA, R. Fundamentos da Catálise. São Paulo: Editora da USP, 1981. p. 377.
- CLAUDINO, A. Preparação de carvão ativado a partir de turfa e sua utilização na remoção de poluentes. 2003. 90p. Dissertação (Mestre em Engenharia Química)
 Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2003.
- COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. Introdução a métodos cromatográficos. Campinas: Editora da Unicamp, 1995.
- ELANDER, R. P. Industrial production of β-lactam antibiotics. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 61, p. 385-392, 2003.
- FLANINGEN, E. M. Zeolites and molecular sieves: an historical perspective. In: BEKKUM, H.; FLANINGEN, E. M.; JANSEN, J. C. Introduction to zeolite science and practice. Amsterdan: Elsevier, 1991. p. 13-34.

- FOULSTONE, M.; READING, C. Assay of amoxicilin and clavulanic acid, the components of Augmentin, in biological fluids with High-Performance Liquid Chromatography. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 22, p. 753-762, 1982.
- FRISCH, M. J.; TRUCKS, G. W.; SCHLEGEL, H. B.; SCUSERIA, G. E.; ROBB, M. A.; CHEESEMAN, J. R.; MONTGOMERY-JR., J. A.; VREVEN, T.; KUDIN, K. N.; BURANT, J. C.; MILLAM, J. M.; IYENGAR, S. S.; TOMASI, J.; BARONE, V.; MENNUCCI, B.; COSSI, M.; SCALMANI, G.; REGA, N.; PETERSSON, G. A.; NAKATSUJI, H.; HADA, M.; EHARA, M.; TOYOTA, K.; FUKUDA, R.; HASEGAWA, J.; ISHIDA, M.; NAKAJIMA, T.; HONDA, Y.; KITAO, O.; NAKAI, H.; KLENE, M.; LI, X.; KNOX, J. E.; HRATCHIAN, H. P.; CROSS, J. B.; BAKKEN, V.; ADAMO, C.; JARAMILLO, J.; GOMPERTS, R.; STRATMANN, R. E.; YAZYEV, O.; AUSTIN, A. J.; CAMMI, R.; POMELLI, C.; OCHTERSKI, J. W.; AYALA, P. Y.; MOROKUMA, K.; VOTH, G. A.; SALVADOR, P.; DANNENBERG, J. J.; ZAKRZEWSKI, V. G.; DAPPRICH, S.; DANIELS, A. D.; STRAIN, M. C.; FARKAS, O.; MALICK, D. K.; RABUCK, A. D.; RAGHAVACHARI, K.; FORESMAN, J. B.; ORTIZ, J. V.; CUI, Q.; BABOUL, A. G.; CLIFFORD, S.; CIOSLOWSKI, J.; STEFANOV, B. B.; LIU, G.; LIASHENKO, A.; PISKORZ, P.; KOMAROMI, I.; MARTIN, R. L.; FOX, D. J.; KEITH, T.; AL-LAHAM, M. A.; PENG, C. Y.; NANAYAKKARA, A.; CHALLACOMBE, M.; GILL, P. M. W.; JOHNSON, B.; CHEN, W.; WONG, M. W.; GONZALEZ, C.; POPLE, J. A. Gaussian 03, Gaussian, Inc., Wallingford, CT, 2004.
- GARCIA, R.; CID, R.; ARRIAGADA, R. Retencion de Cr (III) y Hg (II) en zeolitas. Influencia de la natureza de la zeolita y de variables de proceso. **Bol. Soc. Chil. Quím.**, 1999, v. 44, p. 435-442, 1999.

GIANNETTO, G. Zeolitas. Caracas: Editorial Innovación Tecnológica, 1989.

- GIANNETTO, G. Zeolitas: Caracteristicas, propiedades y aplicaciones industriales. Caracas: Editorial Innovatión Tecnológica, 1990.
- GOSLING, I. S.; COOK, D.; FRY, M. D. M. The role of adsorption isotherms in the design of chromatographic separations for downstream processing.
 Chemical Engineering Research & Design, v. 67, p. 232-242, 1989.
- GOUVEIA, E. R.; BAPTISTA-NETO, A.; AZEVEDO, A. G.; BADINO-JR, A. C.;
 HOKKA, C. O. Improvement of clavulanic acid production by *Streptomyces clavuligerus* in medum containing soybean derivates. World J. Microbiol. Biotechnol., v. 15, p. 623-627, 1999.
- HAGINAKA, J.; NAKAGAWA, T.; UNO, T. Stability of clavulanic acid in aqueous solution. **Chem. Pharm. Bull.**, v. 29, p. 3334-3341, 1981.
- HIRSCHHORN, J. S. Introduction to Powder Metallurgy. New York: American Powder Metallurgy Institute, 1969. 341 p.
- HOWARTH, T. T.; BROWN, A. G.; KING, T. J. Clavulanic acid, a novel β-lactam isolated from *Streptomyces clavuligerus*: X-ray crystal structure analysis. J. Chem. Soc. Chem. Commun., p. 266-267, 1976.
- HUANG, Y. C.; YU, Y. C.; LEE, T. Y. Purification of antibodies by zeolite A. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 17, p. 564-569, 1995.
- KHALEELI, N.; LI, R. F.; TOWNSEND, C. A. Origin of the β-lactam carbons in clavulanic acid from a unusual thiamine pyrophosphatemediated reaction.
 J. Am. Chem. Soc. v. 121, p. 9223-9224, 1999.

- 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.
- KNEZEVIC, Z.; MOJOVIC, L.; ADNADJEVIC, B. Palm oil hydrolysis by lipase from *Candida cylindracea* immobilized on zeolite type Y. Enzyme Microb. Technol, v. 22, p. 275-280, 1998.
- 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.
- LI, S.; LI, C.; LIU, Y.; WANG, X.; CAO, Z. Separation of L-glutamine from fermentation broth by nanofiltration. **Journal of Membrane Science**, v. 222, p. 191-201, 2003.
- LI, R.; TOWNSEND, C. A. Rational strain improvement for enhanced clavulanic acid production by genetic engineering of the glycolytic pathway in *Streptomyces clavuligerus*. **Metabolic Engineering**, v. 8, p. 240-252, 2006.
- LIE, E.; MOLIN, G. Hydrolysis and esterification with immobilized lipase on hydrophobic and hydrophilic zeolites. J. Chem. Technol. Biotechnol., v. 50, p. 549-553, 1991.

- LIM, D.; STRYNADKA, N. C. J. Structural basis for the beta-lactam resistance of PBP2a from methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Nat. Struct. Biol., v. 9, p. 870-876, 2002.
- 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.
- LORENÇO, C. M. Desenvolvimento de processo contínuo de obtenção de frutose a partir de sacarose. 2004. 97 p. Dissertação (Mestre em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.
- LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem., v. 193, p. 265-275, 1951.
- MAITI, S. N.; PHILLIPS, O. A.; MICETICH, R. G.; LIVERMORE, D. M. β-Lactamase inhibitors: agents to overcome bacterial resistance. **Curr. Med. Chem.**, v. 5, p. 441-456, 1998.
- 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. **Bioseparation**, 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. **Chemical Engineering Science**, v. 52, p. 4561-4568, 1997.
- MORÃO, A. I. C.; BRITES ALVES, A. M.; COSTA, M. C.; CARDOSO, J. P. Nanofiltration of a clarified fermentation broth. **Chemical Engineering Science**, v. 61, p. 2418-2427, 2006.
- O'SULLIVAN, J.; SYKES, R. B. β-Lactam antibiotics. In: PAPE, H.; REHM, H. J. **Biotechnology, a comprehensive treatise in 8 volumes.** Weinheim: VCH, 1986.
- OLIVEIRA, E. C.; MASCARENHAS, A. J. S.; PASTORE, H. O. Peneiras Moleculares: Selecionando Moléculas por seu Tamanho. **Química Nova na Escola**, p. 21-30, 2001.
- PAYNE, D. J., CRAMP, R.; WINSTANLEY, D. J.; KNOWLES, D. J. C. Comparative activities of clavulanic acid, sulbactam, and tazobactam against clinically important β-lactamases. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 38, p. 767-772, 1994.
- PEREIRA, A. S.; CARMO FILHO, J. R.; TOGNIM, M. C. B.; SADER, H. S. Avaliação da acurácia de testes laboratoriais para detecção de amostras de *Klebsiella pneumoniae* produtora de betalactamase de espectro estendido. J. Bras. Patol. Med. Lab., v. 39, p. 301-308, 2003.

- PERGHER, S. B. C.; CORMA, A.; FORNES, V. Pillared layered materials: preparation and properties. **Quím. Nova**, v. 22, p. 693-709, 1999.
- 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 β-lactamase inhibitor combinations: focus on ticarcillin/clavulanic acid. Annal. Pharmacother, v. 32, p. S17-21, 1998.
- SARKER, K. K.; SARDAR, D.; SUWA, K.; OTSUKI, J.; SINHA, C. Cadmium(II) complexes of (arylazo)imidazoles: synthesis, structure, photochromism, and density functional theory calculation. **Inorg. Chem.**, v. 46, p. 8291-8301, 2007.
- SAUDAGAR, P. S.; SINGHAL, R. S. Optimization of nutricional requirements and feeding strategies for clavulanic acid production by *Streptomyces clavuligerus*. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 2010-2017, 2007.
- SCHMIDT-KASTNER, G.; GÖLKER, C. Product recovery in biotechnology. In: PRÄVE, P.; FAUST, U.; SITTING, W.; SUKATSCH, D. A. Fundamentals of biotechnology. Weinheim: VCH, 1987. p. 304-306.

SCOPES, R. K. Protein Purification. New York: Springer-Verlag, 1982.

- SEETHARAM, G.; SAVILLE, B. 1-DOPA production from tyrosinase immobilized on zeolite. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 31, p. 747-753, 2002.
- SERRALHA, F. N.; LOPES, J. M.; LEMOS, F.; PRAZERES, D. M. F.; AIRES-BARROS, M. R.; CABRAL, J. M. S.; RAMÔA RIBEIRO, F. Zeolites as

supports for an enzymatic alcoholysis reaction. J. Mol. Catal. B: Enzym., v. 4, p. 303-311, 1998.

- SERRALHA, F. N.; LOPES, J. M.; PRAZERES, D. M. F.; AIRES-BARROS, M. R.; CABRAL, J. M. S.; RIBEIRO, F. R. Kinetics and modelling of an alcoholysis reaction catalyzed by cutinase immobilized on NaY zeolite. J. Mol. Catal. B: Enzym., v. 11, p. 713-718, 2000.
- SERRALHA, F. N.; LOPES, J. M.; AIRES-BARROS, M. R.; PRAZERES, D. M. F.; CABRAL, J. M. S.; RIBEIRO, F. R. Stability of a recombinant cutinase immobilized on zeolites. Enzyme Microb. Technol, v. 31, p. 29-34, 2002.
- SILVA, C. F. Efeitos da troca iônica em zeólitas na adsorção de frutose. 1998. 96 p. Dissertação (Mestre em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1998.
- STEIN, G. E.; GURWITH, M. J. Amoxicillin-potassium clavulanate, a β-lactamaseresistant antibiotic combination. **Clin. Pharm.**, v. 3, p. 591-599, 1984.
- 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.
- TESSIERA, L.; BOUCHARD, P.; RAHNIC, M. Separation and purification of benzylpenicillin produced by fermentation using coupled ultrafiltration and nanofiltration technologies. **Journal of Biotechnology**, v. 116, p. 79-89, 2005.
- VALENTINE, B. P.; BAILEY, A.; DOHERTY, J.; MORRIS, S.; ELSON, S. W.; BAGGALEY, K. H. Evidence that arginine is a later metabolic intermediate than ornithine in the biosynthesis of clavulanic acid by *Streptomyces clavuligerus*. J. Chem. Soc. Chem. Common., v. 1993, p. 1210-1211, 1993.
- WANG, K. Y.; CHUNG, T. The characterization of flat sheet membranes and their applications in the separation of cephalexin. **Journal of Membrane Science**, v. 247, p. 37-50, 2005.
- WEBER, G.; BENOIT, F.; BELLAT, J. P.; PAULIN, C.; MOUGIN, P.; THOMAS, M. Selective adsorption of ethyl mercaptan on NaX zeolite. Microporous and Mesoporous Materials, v. 109, p. 184-192, 2008.
- YAN, C; LIU, S.; ZHOU, Y.; SONG, F.; CUI, M.; LIU, Z. A study of isomeric diglycosyl flavonoids by SORI CID of Fourier transform ion cyclotron mass spectrometry in negative ion mode. J. Am. Soc. Mass Spectrom., v. 18, p. 2127-2136, 2007.
- YANG, J.; CHOO, J.; KWON, O.; LAANE, J. Theoretical calculations and vibrational spectra of 1,4-benzodioxan in its S₁ (π , π *) electronic excited state. **Spectrochimica Acta Part A**, v. 68, p. 1170-1173, 2007.
- 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.