

Universidade Estadual de Campinas
Faculdade de Engenharia de Alimentos
Departamento de Engenharia de Alimentos

**ESTUDO EXPERIMENTAL E TEÓRICO DA SEPARAÇÃO
DE CEFALOSPORINA C EM COLUNA DE LEITO FIXO**

Autor: Carlos André Veiga Burkert

Engenheiro Químico, FURG, 1991

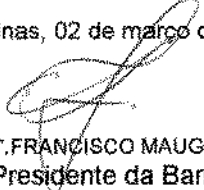
Orientador: Prof. Dr. Francisco Maugeri Filho

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

PARECER

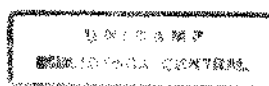
Este exemplar corresponde à
redação final da tese defendida por
CARLOS ANDRÉ VEIGA BURKERT
aprovada pela Comissão Julgadora
em 02 de março de 1998.

Campinas, 02 de março de 1998.


Prof. Dr. FRANCISCO MAUGERI FILHO
Presidente da Banca

Campinas-SP

1998



UNIDADE	BC
N.º CHAMADA	
TÍTULO	
V.	
TOTAL	33916
PRIMEIRO	395198
	018
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	20/05/98
N.º CPD	

CM-00111253-6

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA F.E.A. - UNICAMP

B917e

Burkert, Carlos André Veiga

Estudo experimental e teórico da separação de Cefalosporina C em coluna de leito fixo / Carlos André Veiga Burkert. – Campinas, SP: [s.n], 1998.

Orientador : Francisco Maugeri Filho.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Cefalosporina C. – Purificação. 2. Leito fixo. 3. Adsorção.
4. Modelos matemáticos. I. Maugeri Filho, Francisco.
II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

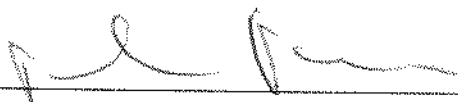
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Francisco Maugeri Filho

Orientador

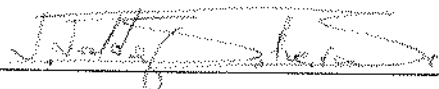
(FEA/DEA/UNICAMP)



Profa. Dra. Telma Teixeira Franco

Membro

(FEQ/UNICAMP)



Prof. Dr. Vivaldo Silveira Júnior

Membro

(FEA/DEA/UNICAMP)

Prof. Dr. Rubens Maciel Filho

Membro

(FEQ/UNICAMP)

DEDICATÓRIA

À Janaína, meu grande amor.

*Aos meus pais, Fernando e Jocelina,
pelo amor, apoio, confiança e compreensão.*

AGRADECIMENTOS

- ◆ *A Deus e à espiritualidade maior.*
- ◆ *Ao Prof. Dr. Francisco Maugeri Filho, pela orientação, amizade e confiança demonstrados durante a realização deste trabalho.*
- ◆ *À Profa. Dra. Maria Isabel Rodrigues, pela amizade e energia positiva com que sempre foi possível contar.*
- ◆ *À Banca Examinadora, pela atenção, sugestões e correções.*
- ◆ *À CAPES, pelo apoio financeiro.*
- ◆ *À Fundação Universidade do Rio Grande, por ter possibilitado meu afastamento no período de realização do curso.*
- ◆ *À minha irmã Rozania e minha sobrinha Fernanda, pelo amor e carinho sempre demonstrados.*
- ◆ *Aos meus grandes amigos Flávio e Mauro, verdadeiros irmãos que encontrei em Campinas, companheiros em todos os momentos e com quem aprendi muito sobre a vida.*
- ◆ *À minha grande amiga Susana, pela amizade e apoio demonstrados em tantos momentos.*
- ◆ *Aos amigos Alessandra, Álvaro, Fábia, Gustavo, Kity, Lia, Marió, Priscila e Rosi, pela amizade e momentos compartilhados.*
- ◆ *À amiga Ana, pela amizade e auxílio que sempre recebi.*
- ◆ *Aos colegas do laboratório de Bioengenharia, em especial Fifa, Eliana e Marlei, pelo auxílio e sugestões apresentados no decorrer do trabalho.*
- ◆ *Aos colegas, funcionários e professores da FEA/UNICAMP.*

SUMÁRIO

Índice de Figuras.....	iv
Índice de Tabelas.....	vi
Nomenclatura.....	vii
Resumo.....	xi
Summary.....	xii
1. Introdução.....	01
2. Revisão Bibliográfica.....	03
2.1. Antibióticos.....	03
2.1.1. Generalidades.....	03
2.1.2. As Cefalosporinas.....	04
2.2. Métodos de Purificação.....	06
2.2.1. Aspectos Gerais.....	06
2.2.2. Métodos Cromatográficos de Purificação.....	07
2.2.3. Cromatografia de Adsorção.....	09
2.2.3.1. Adsorventes poliméricos não-polares.....	09
2.2.3.2. Interações cefalosporina C - amberlite XAD-2.....	11
2.2.3.3. Fatores envolvidos no desempenho da cromatografia de adsorção.....	13
2.2.4. Processos de Purificação de Cefalosporina C.....	14

2.3. Teoria da Adsorção em Leito Empacotado.....	17
2.3.1. Isotermas de Adsorção.....	17
2.3.2. Curvas de Ruptura ("Breakthrough Curves").....	21
2.3.3. Modelagem Matemática.....	24
2.4. Comentários.....	27
3. Modelagem Matemática.....	28
3.1. Cinética da Adsorção.....	28
3.2. Modelo Matemático para Transferência de Massa.....	30
3.2.1. Transferência de Massa Externa à Partícula.....	30
3.2.2. Transferência de Massa Interna à Partícula.....	35
3.3. Programação em Pascal.....	37
4. Metodologia.....	39
4.1. Ensaios Experimentais de Separação de Cefalosporina C em Coluna de Leito Fixo.....	39
4.1.1. Preparo da Resina Amberlite XAD-2.....	39
4.1.2. Separação de Cefalosporina C em Coluna de Leito Fixo - determinação das curvas de ruptura.....	40
4.1.3. Análise de Sensibilidade dos Parâmetros Geométricos e Operacionais da Coluna	43
4.2. Ajuste dos Parâmetros do Modelo Matemático.....	44

5. Resultados e Discussões.....	47
5.1. Ensaios Experimentais de Separação de Cefalosporina C em Coluna de Leito Fixo.....	47
5.2. Fator de Sensibilidade dos Parâmetros Geométricos e Operacionais da Coluna.....	52
5.3. Ajuste dos Parâmetros do Modelo Matemático.....	53
6. Conclusões.....	59
7. Sugestões e Recomendações.....	60
8. Referências Bibliográficas.....	61

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1: Estrutura básica das cefalosporinas.....	04
Figura 2.2: Amberlite XAD - 2. (a) Estrutura da partícula da resina. (b) Representação esquemática do fenômeno da adsorção.....	10
Figura 2.3: Configuração de mínima energia para o complexo cefalosporina C - benzeno.....	12
Figura 2.4: Isotermas de adsorção.....	18
Figura 2.5: (a) Curva de ruptura para adsorção em coluna de leito fixo. (b) Perfil de concentração ao longo da coluna no tempo de ruptura (t_b).....	21
Figura 2.6: Influência do formato da curva de ruptura no desempenho de colunas de leito fixo. (a) Tipo de curva obtida em coluna empacotada. (b) Curva com inclinação mais acentuada, obtida na mesma coluna, com alteração das condições operacionais.....	23
Figura 2.7: Mecanismos envolvidos em uma cromatografia. (a) Transferência de massa através do filme líquido. (b) Difusão nos poros. (c) Adsorção/dessorção. (d) Difusão na fase sólida.....	26
Figura 3.1: Esquema de uma coluna contendo Amberlite XAD-2 para separação de cefalosporina C.....	30
Figura 3.2: Diagrama em blocos do programa para simulação da separação de cefalosporina C em coluna de leito fixo.....	38
Figura 4.1: (a) Montagem experimental para separação de cefalosporina C em coluna de leito fixo. (b) Coluna cromatográfica utilizada.	

Figura 5.1: Influência de L/θ na curva de ruptura obtida na separação de cefalosporina C em coluna de leito fixo. $C_0 = 0,06$ g/l; $d_p/\theta = 0,0297$; $v = 0,306$ m/h.....	48
Figura 5.2: Influência de d_p/θ na curva de ruptura obtida na separação de cefalosporina C em coluna de leito fixo. $C_0 = 0,06$ g/l; $L/\theta = 5$; $v = 0,306$ m/h.....	49
Figura 5.3: Influência de v na curva de ruptura obtida na separação de cefalosporina C em coluna de leito fixo. $C_0 = 0,06$ g/l; $L/\theta = 5$; $d_p/\theta = 0,0297$	50
Figura 5.4: Valores experimentais e preditos pelo modelo matemático, até o tempo de ruptura. $C_0 = 0,06$ g/l; $L/\theta = 5$; $d_p/\theta = 0,0297$; $v = 0,306$ m/h.....	57
Figura 5.5: Valores experimentais e preditos com o ajuste do modelo matemático. $C_0 = 0,06$ g/l; $L/\theta = 5$; $d_p/\theta = 0,0297$; $v = 0,306$ m/h.....	58

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 2.1: Resíduos R_1 , R_2 e R_3 dos principais compostos β - lactâmicos presentes em culturas de <i>Cephalosporium acremonium</i>	05
Tabela 2.2: Classificação dos métodos cromatográficos de acordo com as interações adsorvente-soluto.....	08
Tabela 4.1: Propriedades físicas típicas do adsorvente Amberlite XAD-2.....	39
Tabela 4.2: Condições geométricas e operacionais para os experimentos de separação de cefalosporina C em coluna de Amberlite XAD-2.....	42
Tabela 4.3: Estimativas iniciais para os parâmetros do modelo matemático.....	45
Tabela 5.1: Resultados obtidos nos experimentos de separação de cefalosporina C em coluna de leito fixo.....	47
Tabela 5.2: Dados obtidos por FIROUZTALE <i>et alii</i> (1994) em simulações de separação de cefalosporina C em coluna de leito fixo contendo a resina Amberlite XAD-16.....	51
Tabela 5.3: Dados obtidos por FIROUZTALE <i>et alii</i> (1994) em simulações de separação de cefalosporina C em coluna de leito fixo contendo a resina Amberchrom CG-161M.....	52
Tabela 5.4: Fator de sensibilidade dos parâmetros geométricos e operacionais da coluna.....	53
Tabela 5.5: Valores estimados e ajustados dos parâmetros do modelo matemático pelo método simplex modificado.....	54
Tabela 5.6: Valores estimados para o coeficiente de transferência de massa, difusividade efetiva e número de Biot nos experimentos realizados.....	55

NOMENCLATURA

A	Sítios livres do adsorvente	-
Bi	Número de Biot	-
C	Concentração de cefalosporina C em solução	kg/m ³
C/C_{0 exp}	Relação entre a concentração de cefalosporina C no meio e a concentração de alimentação, obtida experimentalmente	-
C/C_{0 sim}	Relação entre a concentração de cefalosporina C no meio e a concentração de alimentação, obtida por simulação	-
C_b	Concentração de ruptura da cefalosporina C	kg/m ³
C_e	Concentração de exaustão da cefalosporina C	kg/m ³
C_m	Concentração de cefalosporina C no meio (fase móvel)	kg/m ³
C₀	Concentração de cefalosporina C na alimentação	kg/m ³
C_r	Concentração de cefalosporina C em solução no poro da partícula	kg/m ³
C_s	Concentração de cefalosporina C na superfície da partícula de resina	kg/m ³
D_m	Difusividade molecular da cefalosporina C em solução	m ² /h
D_{ef}	Difusividade efetiva	m ² /h
d_p	Diâmetro da partícula de resina	m
E	Coefficiente de dispersão axial	m ² /h
FO	Função objetivo a ser minimizada	-
FO_i	Função objetivo no vértice i do simplex	-

FO_i	Valor médio de FO _i	-
i	Índice correspondente à posição radial	-
J	Fluxo de massa por unidade de área	kg/m ² h
j	Índice correspondente ao tempo	-
k	Constante da isoterma linear	-
K_d	Constante de dissociação para adsorção (modelo de Langmuir)	kg/m ³
k_f	Constante da isoterma de Freundlich	(g/l) ^{(n-1)/n}
K_s	Coefficiente global de transferência de massa	m/h
k₁	Constante cinética de adsorção (modelo de Langmuir)	(kg/m ³) ⁻¹ h ⁻¹
k₂	Constante cinética de adsorção (modelo de Langmuir)	h ⁻¹
L	Comprimento do leito	m
m	Número de parâmetros a otimizar	-
N	Número de pontos considerados no ajuste	-
n_f	Constante da isoterma de Freundlich	-
N_{Re}	Número de Reynolds	-
N_{Sc}	Número de Schmidt	-
N_{Sh}	Número de Sherwood	-
P	Produtividade	kg/h
Q	Quantidade de cefalosporina C adsorvida na resina	kg/m ³
Q_b	Quantidade de cefalosporina C adsorvida no tempo de ruptura	kg

Q_c	Quantidade de cefalosporina C adsorvida no tempo de exaustão	kg
Q_m	Quantidade máxima de cefalosporina C que pode ser adsorvida na resina	kg/m ³
Q_{perd}	Cefalosporina C perdida no efluente	kg
r	Distância radial	m
R	Raio da partícula de resina	m
R_c	Taxa de adsorção da cefalosporina C no VDC	kg/m ³ h
S	Fator de sensibilidade	-
S_1	Capacidade usada da coluna	kg
S_2	Soluto perdido no efluente	kg
S_3	Capacidade da coluna não utilizada	kg
t	Tempo	h
t_b	Tempo de ruptura	h
t_e	Tempo de exaustão	h
u	Velocidade intersticial	m/h
v	Velocidade superficial	m/h
V_z	Vazão volumétrica	m ³ /h
Z	Distância axial	m
z	Índice correspondente à posição axial	-

Termos Gregos

$\alpha, \beta, \gamma, \delta$	Coeficientes da equação geral de transferência de massa externa	h^{-1}
$\alpha_{1[i]}, \beta_1, \gamma_{1[i]}, \delta_1$	Coeficientes da equação geral de transferência de massa interna	h^{-1}
Δr	Passo de r	m
Δt	Passo de t	m
ε	Porosidade do leito	-
ε_p	Porosidade da partícula	-
ϕ_1	Eficiência de utilização do leito	-
ϕ_2	Eficiência de recuperação da cefalosporina C	-
μ	Viscosidade	$kg/m.s$
θ	Diâmetro da coluna	m
ρ	Densidade	kg/m^3
ω	Parâmetro de convergência	-

RESUMO

A cefalosporina C é um importante antibiótico β - lactâmico, obtida por cultivo de fungos do gênero *Cephalosporium*, constituindo a matéria-prima para a síntese de inúmeros antibióticos de largo espectro de ação microbiana, sendo que sua recuperação e purificação constitui a etapa mais onerosa do processo. Neste trabalho realizou-se um estudo experimental a respeito da separação de cefalosporina C em coluna de leito fixo contendo Amberlite XAD-2 como adsorvente, verificando o comportamento das curvas de ruptura em diferentes condições geométricas e operacionais (relação comprimento do leito - diâmetro da coluna L/θ , relação diâmetro da partícula - diâmetro da coluna d_p/θ , velocidade superficial v), bem como o efeito destas variáveis sobre a eficiência de utilização do leito da coluna, quantidade de cefalosporina C adsorvida e produtividade, através da determinação do fator de sensibilidade. Foi proposto um modelo matemático para a adsorção de cefalosporina C em coluna de leito fixo que considerou a resistência externa e interna à transferência de massa, assim como a dispersão axial. Este modelo foi obtido a partir de balanços de massa e equações cinéticas de adsorção (isoterma de Langmuir), com resolução numérica através do método de Crank-Nicolson para as equações diferenciais parciais, utilizando matrizes tridiagonais, e do método de Runge-Kutta de 4^a ordem para as equações diferenciais ordinárias. Para o ajuste dos parâmetros do modelo matemático aplicou-se o método simplex geométrico flexível de NELDER & MEAD (1965), conhecido como método dos poliedros flexíveis ou simplex modificado. Os resultados experimentais mostraram que o aumento de L/θ e a redução de d_p/θ e v melhoraram a eficiência de utilização do leito da coluna e a quantidade de cefalosporina C adsorvida no tempo de ruptura. A produtividade foi incrementada com o aumento de L/θ e v , e com a redução de d_p/θ . Além disso, foi observado que o processo de adsorção é limitado pela transferência de massa interna, sendo que a difusão intraparticular é a etapa limitante do processo. Finalmente, o ajuste dos parâmetros do modelo matemático mostrou que as estimativas iniciais adotadas para as constantes cinéticas e de equilíbrio da isoterma de Langmuir foram satisfatórias e que a curva de ruptura foi muito afetada pela difusividade efetiva e porosidade do leito.

SUMMARY

Cephalosporin C is a β - lactam antibiotic, produced by *Cephalosporium* in submerged culture, constituting the raw material of several synthetic antibiotics. Its purification is the most expensive step of the process. In this work, an experimental investigation on cephalosporin C separation in fixed bed column with Amberlite XAD-2, describing the behavior of breakthrough curves at different conditions (bed depth - column diameter ratio L/θ , particle size - column diameter ratio d_p/θ , superficial velocity v), was carried out. The effect of these variables in the bed utilisation efficiency, adsorbed cephalosporin C and productivity was analyzed using the sensitivity factor. A mathematical model for the cephalosporin C adsorption in fixed bed column was suggested, considering internal and external mass transfer resistances and axial dispersion. This model was obtained from a mass balance and kinetic equations of adsorption (Langmuir isotherm). The numerical resolution was obtained using Crank-Nicolson method for the partial differential equations and 4th order Runge-Kutta method for the ordinary differential equations. The model parameters fitting was performed using simplex method (NELDER & MEAD, 1969). The experimental results showed that an increase in L/θ and a decrease in d_p/θ and v lead to an improve in the bed utilisation efficiency and in adsorbed cephalosporin C at the time to breakthrough. Productivity was increased with an increase in L/θ and v , and with a decrease in d_p/θ . Moreover, it was observed that adsorption process is limited by internal mass transfer. Intraparticle diffusion is the process critical step. The fitted parameters showed that the initial estimates for the kinetics and equilibrium constants according to a Langmuir isotherm were satisfactory. Finally, the effective diffusivity and bed porosity affected considerably the breakthrough curves.

1. INTRODUÇÃO

Durante a II Guerra Mundial a demanda por agentes quimioterapêuticos conduziu ao desenvolvimento do primeiro processo de produção de antibiótico em grande escala, a penicilina, descrita por Alexander Fleming em 1929 e isolada por Florey e Clain em 1940. Iniciava-se a era de investigação sobre antibióticos, que propiciou avanços importantes no campo da esterilização, aeração e crescimento de microrganismos, bem como nas técnicas de purificação de produtos biológicos.

Até 1960 os principais produtos biotecnológicos foram os antibióticos. Mediante intensos esforços da indústria farmacêutica, novos compostos foram descobertos e produzidos em escala comercial (CRUEGER & CRUEGER, 1993).

Em 1945, na ilha de Sardenha, Giuseppe Brotzu isolou da água do mar um organismo com atividade antibiótica sobre bactérias Gram positivas e Gram negativas, sendo identificado como *Acremonium chrysogenum*, tendo sido observada a produção de dois compostos: cefalosporina N e P.

A cefalosporina N (penicilina N) foi purificada por Abraham e colaboradores em 1954, sendo que observaram a presença de um segundo antibiótico, cefalosporina C, que apresentava resistência à enzima penicilase, ao contrário da cefalosporina N, iniciando um novo capítulo na história da indústria de antibióticos (NEWTON & ABRAHAM, 1955).

As cefalosporinas naturais, antibióticos β - lactâmicos, são produzidas comercialmente principalmente por cepas de *Cephalosporium acremonium*. Por hidrólise da cefalosporina C tem-se o ácido 7-aminocefalosporânico, a partir do qual obtém-se diversas cefalosporinas semi-sintéticas mais potentes, similares às penicilinas de espectro ampliado, apresentando ainda vantagens, como menor incidência de reações alérgicas e possibilidade de administração por via oral. Constituem o grupo mais importante de antibióticos, com aproximadamente 29 % do mercado mundial (CRUEGER & CRUEGER, 1993).

Pelo fato do Brasil depender quase que exclusivamente da importação de matérias-primas para fabricação de antibióticos, caso da cefalosporina C, torna-se importante o domínio do processo para sua produção.

Esse processo pode ser dividido em duas etapas distintas: o cultivo do fungo para produção de cefalosporina C, e a recuperação e purificação desta, presente em pequenas concentrações no líquido fermentado. Esta última representa grande parcela do custo de produção, sendo a otimização dessa etapa determinante da competitividade do produto no mercado.

É necessário, portanto, técnicas eficientes de otimização e “scale-up” para essa purificação. Um método consiste em desenvolver modelos matemáticos que, uma vez validados, podem ser utilizados no estudo do efeito de cada variável na eficiência da purificação, em diferentes escalas, dispensando ensaios experimentais dispendiosos. Todavia, este tema ainda é pouco explorado em pesquisa.

Por sua natureza hidrofílica, a cefalosporina C é separada por adsorção cromatográfica, ao contrário da penicilina G, hidrofóbica, extraída do meio de cultura por solventes orgânicos.

Este trabalho tem por objetivo um estudo experimental preliminar a respeito da separação de cefalosporina C em coluna de leito fixo contendo Amberlite XAD-2 como adsorvente (processo convencional), verificando o comportamento das curvas de ruptura em diferentes condições geométricas e operacionais (relação comprimento do leito - diâmetro da coluna, relação diâmetro da partícula - diâmetro da coluna, velocidade superficial), bem como a avaliação, através do fator de sensibilidade, do impacto destas variáveis sobre a eficiência de utilização leito de partículas da coluna, quantidades adsorvidas de cefalosporina C no tempo de ruptura e no tempo de exaustão e produtividade.

Também objetiva-se a proposição de um modelo matemático que represente o processo, elaborando uma metodologia para sua validação, que consiste no ajuste dos parâmetros do modelo matemático por regressão não-linear, através do método simplex geométrico flexível de NELDER & MEAD (1965), ou simplex modificado.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Antibióticos

2.1.1. Generalidades

ZÄHNER (1978), citado por CRUEGER & CRUEGER (1993), define os antibióticos como produtos do metabolismo secundário que inibem o processo de crescimento de outros microrganismos, mesmo quando em baixas concentrações, sendo produzidos por grande número de bactérias, actinomicetos e fungos.

De acordo com BERDY (1985), citado por CRUEGER & CRUEGER (1993), os antibióticos podem ser classificados de acordo com sua estrutura química, podendo ser agrupados em 9 categorias: antibióticos que contêm carboidratos; lactonas macrocíclicas; quinonas e antibióticos relacionados; aminoácidos e antibióticos peptídicos; antibióticos heterocíclicos que contêm nitrogênio; antibióticos heterocíclicos que contêm oxigênio; derivados alicíclicos; antibióticos aromáticos; antibióticos alifáticos.

Os antibióticos β - lactâmicos estão incluídos na classe dos antibióticos peptídicos. São caracterizados pela fusão de um anel lactâmico de 4 membros e um anel de 5 ou 6 membros contendo enxofre, podendo ser divididos em 5 grupos diferentes, sendo que as penicilinas e cefalosporinas estão entre os mais efetivos agentes terapêuticos para o controle de enfermidades infecciosas.

Conforme GHOSH *et alii* (1996), para uma produção mundial de 50.000 toneladas de antibióticos, o grupo de antibióticos β - lactâmicos contribuiu com 30.000 toneladas.

2.1.2. As Cefalosporinas

As cefalosporinas naturais são obtidas a partir do cultivo de fungos, principalmente *Cephalosporium acremonium*, sendo a mais importante a cefalosporina C. Contudo, terapeuticamente só utilizam-se derivados semi-sintéticos.

Antibióticos cefalosporânicos são também produzidos por outros fungos, como *Emericellopsis* e *Paecilomyces*, e em 1971 foram encontradas as primeiras cefamicinas (7-metoxi-cefalosporinas), produzidas por várias espécies de *Streptomyces* e por *Nocardia lactamdurans*.

O núcleo químico comum às cefalosporinas é constituído por um sistema anelar formado por um anel β - lactâmico e um anel hexagonal de dihidrotiazina, como observado na figura 2.1.

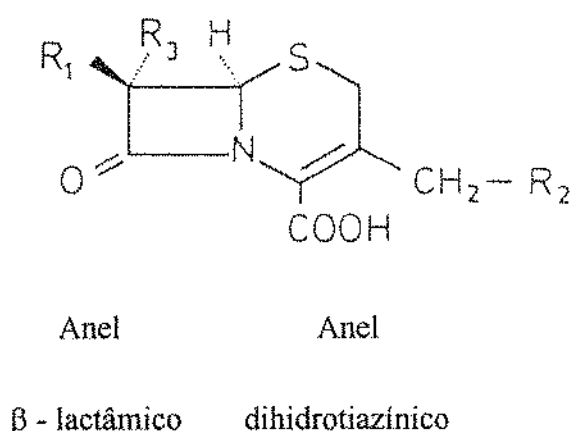


Figura 2.1: Estrutura básica das cefalosporinas. Fonte: Crueger & Crueger (1993).

As distintas cefalosporinas distinguem-se por suas cadeias laterais (R_1 , R_2 e R_3), e por sua origem classificam-se em naturais e semi-sintéticas (primeira, segunda e terceira geração).

As principais cefalosporinas naturais presentes em filtrados de cultura de *Cephalosporium acremonium* são as cefalosporinas C, N e P, bem como desacetilcefalosporina C e desacetoxicefalosporina C, intermediárias da biossíntese da

cefalosporina C, e ácido 7-aminocefalosporânico (VOSER & WEISS, 1980). Os resíduos R_1 , R_2 e R_3 correspondentes são mostrados na tabela 2.1.

SHEN *et alii* (1986) comentam que as cepas industriais de *Cephalosporium acremonium* C-10 e CW-19, disponíveis para a comunidade científica, produzem 3,6 g/l e 1,15 g/l, respectivamente.

Por hidrólise da cefalosporina C, separando-se a cadeia lateral alifática unida ao anel β -lactâmico, obtém-se o ácido 7-aminocefalosporâmico (7-ACA), a partir do qual obtém-se diversas cefalosporinas semi-sintéticas mais potentes (de primeira geração), similares às penicilinas de espectro ampliado, como ampicilina e amoxilina, podendo ser usadas para estafilococos resistentes à penicilina. As cefalosporinas de segunda e terceira geração apresentam espectro de ação crescente. Cefapirina, cefamandole, cefazolina, cefalexina, cefalotina, cefaloglicina, cefradina, cefaloridina, cefazolina, cefuroxima e cefoxitina são algumas cefalosporinas semi-sintéticas importantes citadas por GOSH *et alii* (1997).

Tabela 2.1: Resíduos R_1 , R_2 e R_3 dos principais compostos β -lactâmicos presentes em culturas de *Cephalosporium acremonium*.

Produto	R_1	R_2	R_3
Cefalosporina C	NH_2	$-\text{OCOCH}_3$	$-\text{H}$
Desacetilcefalosporina C	$\left\{ \begin{array}{l} \\ \text{CH} - (\text{CH}_2)_3 \text{CO} - \\ \\ \text{COOH} \end{array} \right.$	$-\text{OH}$	$-\text{H}$
Desacetoxicefalosporina C		$-\text{H}$	$-\text{H}$
Ácido 7-Aminocefalosporânico	$-\text{NH}_2$	$-\text{OCOCH}_3$	$-\text{H}$

Fonte: Voser & Weiss (1980).

Segundo GALE *et alii* (1972) a mudança na atividade sobre bactérias Gram positivas e Gram negativas resulta de alterações nas cadeias laterais da molécula de cefalosporina C.

As modificações no anel β - lactâmico podem ser feitas em 3 posições distintas, 7 α , 7 β e 3, sendo que nas posições 7 α e 7 β há significativo aumento da resistência a β - lactamases (SMITH, 1985).

A ação das cefalosporinas é especialmente bactericida, inibindo a síntese do mucopeptídio peptoglicano, que forma a parede celular bacteriana. De acordo com GALE *et alii* (1972) as cefalosporinas inibem a enzima transpeptidase, essencial na formação do peptoglicano, formando irreversivelmente um complexo inativo.

Conforme NEWTON & ABRAHAM (1955) a cefalosporina C é hidrofílica e quimicamente anfotérica, sendo estável em soluções aquosas de pH 3 à temperatura ambiente, mas é rapidamente inativada em pH 12. Os valores de pK dos grupos ácidos são 3,1 e 2,6, e o grupo básico tem pK de 9,8. O espectro de absorção da luz ultravioleta mostra absorção máxima para o comprimento de onda de 260 nm.

2.2. Métodos de Purificação

2.2.1. Aspectos Gerais

Um dos aspectos mais críticos de um processo de fermentação industrial é a recuperação e purificação do bioproduto. A seleção das etapas apropriadas depende da natureza do produto final, sua concentração, subprodutos presentes, estabilidade do material biológico e grau de purificação necessário (CRUEGER & CRUEGER, 1993).

De acordo com BAILEY & OLLIS (1986) um processo de purificação típico pode ser dividido em 4 etapas principais.

Primeiramente, o produto é separado dos organismos produtores e outros materiais insolúveis por uma separação sólido-líquido, como por exemplo filtração ou centrifugação, podendo haver necessidade de ruptura das células, no caso de substâncias intracelulares.

Na segunda etapa, substâncias que diferem consideravelmente em suas propriedades físico-químicas são removidas do produto. Os métodos usados são não - específicos, como “salting-out”, extração por solvente, ultrafiltração ou adsorção. Esta etapa pode resultar em considerável aumento da concentração de produto, o que facilita as etapas seguintes de purificação.

Na purificação, empregam-se métodos altamente seletivos para remover substâncias que tem propriedades muito semelhantes às do produto, como os métodos cromatográficos, precipitação por bioafinidade e eletroforese.

A quarta etapa, separação final do produto, inclui cristalização, centrifugação ou liofilização do produto final, estando relacionada à forma de comercialização do produto.

2.2.2. Métodos Cromatográficos de Purificação

Segundo WANG (1990) bioprodutos são geralmente produzidos em baixas concentrações no meio de fermentação, de composição complexa, sendo que técnicas de separação altamente seletivas como as cromatográficas são normalmente usadas para isolar e purificar esses bioprodutos, devido aos solutos na mistura apresentarem afinidades distintas com o adsorvente, consequência das diferenças no tamanho molecular, distribuição de cargas, forças eletrostáticas de grupos carregados, hidrofobicidade ou pontes de hidrogênio.

CHASE (1984) comenta que o produto desejado (adsorvato) liga-se ao suporte insolúvel, ficando portanto adsorvido à fase estacionária. Considerando que a ligação seja suficientemente forte, compostos indesejáveis podem ser removidos por lavagem, sem perda de adsorvato. Por alteração das condições químicas ou físicas, o adsorvato pode ser removido do adsorvente, o que se denomina eluição ou dessorção. Após a eluição, o adsorvente pode ser regenerado para uso em outro ciclo de operação.

GHOSH *et alii* (1996) mencionam que os métodos cromatográficos são vantajosos por apresentarem condições brandas de operação (temperatura ambiente e meios tamponados), simplicidade para ampliação de escala e capacidade de obter-se um alto grau de pureza e recuperação do produto.

Conforme COLLINS (1995) os métodos cromatográficos podem ser classificados de acordo com o mecanismo de separação envolvido, que pode ser por processos físicos, químicos ou mecânicos, como mostrado na tabela 2.2.

A cromatografia de adsorção é baseada na distribuição de substâncias entre uma fase móvel e uma fase estacionária, devido a interações entre os componentes e a superfície cromatográfica (FREITAG & HORVÁTH, 1995).

De acordo com VOSER (1982) este método cromatográfico é baseado na interação de um soluto com a superfície do adsorvente por forças de van der Waals, servindo principalmente para enriquecer a solução em produto, tornando as etapas subsequentes, como a cromatografia de troca iônica, mais eficientes.

Tabela 2.2: Classificação dos métodos cromatográficos de acordo com as interações adsorvente-soluto.

Tipo	Processo	Interação Molecular
Físico	Adsorção	Forças de van der Waals
Físico	Absorção/Partição	Polaridade
Químico	Troca Iônica	Carga
Químico	Cromatografia de Afinidade	Atração Bioespecífica
Mecânico	Filtração em Gel	Difusão em Poros

Fonte: Collins (1995).

COLLINS (1995) comenta que, quando a fase estacionária é um líquido, espalhado na superfície de um suporte sólido inerte, o processo é intrafacial, ocorrendo por absorção, ou partição, que se baseia nas diferentes solubilidades dos componentes da amostra na fase estacionária. O retorno dos componentes à fase móvel depende de sua volatilidade (fase móvel gasosa), ou de sua solubilidade nesta fase (fase móvel líquida).

Conforme BAILEY & OLLIS (1986) a cromatografia de troca iônica consiste na passagem da solução através de uma coluna de leito fixo contendo resina de troca iônica. O

soluto liga-se à resina por forças eletrostáticas, cuja intensidade depende do pH de alimentação. A eluição é feita com tampões de pH e/ou força iônica adequados, possibilitando uma dessorção sequencial das espécies ligadas à resina.

A cromatografia por afinidade envolve interações altamente específicas baseadas no reconhecimento molecular, com efeito combinado de forças de van der Waals, forças eletrostáticas, forças hidrofóbicas, pontes de hidrogênio e complementaridade estérica (FREITAG & HORVÁTH, 1995).

Na filtração em gel, a coluna é empacotada com partículas de gel com poros de tamanho característico. Moléculas maiores que esses poros não podem difundir-se através do gel, passando rapidamente através da coluna, enquanto moléculas menores penetram no gel e movem-se mais lentamente (BAILEY & OLLIS, 1986).

2.2.3. Cromatografia de Adsorção

2.2.3.1. Adsorventes poliméricos não-polares

KIRKBY *et alii* (1986) comentam que a cromatografia de fase reversa é um importante método para a recuperação de cefalosporina C de meios de cultura, usando resinas macroporosas não - polares de poliestireno.

Resinas de poliestireno não-polares são indicadas especialmente para o isolamento de metabólitos secundários de baixo peso molecular, caso da cefalosporina C. VOSER (1982) menciona o uso de Amberlite XAD - 2 na purificação de cefalosporina C.

De acordo com GJERDE & FRITZ (1987) a resina é preparada pela polimerização do estireno, no entanto uma pequena quantidade de divinilbenzeno é adicionada durante a polimerização para a reticulação ("crosslinking") da resina. O "crosslinking" confere estabilidade mecânica e diminui sensivelmente a solubilidade do polímero por aumento do peso molecular.

Cada partícula da resina macroreticular contém muitas microesferas, intercaladas por canais, conferindo uma área superficial muito elevada. Na figura 2.2 é ilustrada a estrutura da partícula de resina Amberlite XAD-2 e o fenômeno de adsorção em uma seção desta resina.

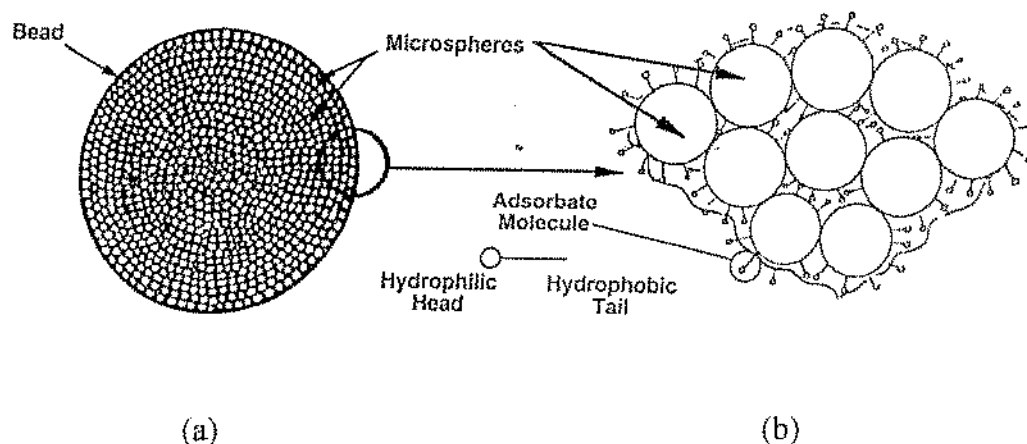


Figura 2.2: Amberlite XAD-2. (a) Estrutura da partícula da resina. (b) Representação esquemática do fenômeno da adsorção. (—) representa a seção hidrofóbica do adsorbato. (°) representa a seção hidrofílica do adsorbato. Fonte: Rohm & Haas Company (1989).

Em moléculas presentes em soluções aquosas, com uma extremidade hidrofílica e uma hidrofóbica, esta última é atraída por adsorventes não-polares, tais como Amberlite XAD-2 e Amberlite XAD-4, enquanto que a seção hidrofílica da molécula permanece orientada na fase aquosa. Além disso, a seletividade e a extensão da adsorção aumentam com a hidrofobicidade da molécula orgânica. Portanto, por mudança no balanço hidrofóbico/hidrofílico da molécula adsorvida, pode-se mudar a extensão da adsorção.

A resina Amberlite XAD-2 é considerada excelente com respeito às suas propriedades de eluição e regeneração, seletividade e estabilidade química e mecânica. A capacidade de adsorção, no entanto, é relativamente baixa (VOSER, 1982).

KASTNER & GÖLKER (1987) mencionam que a capacidade da resina Amberlite XAD-2 é de aproximadamente 7 g/l de resina úmida para cefalosporina C oriunda de filtrado de cultura de *Cephalosporium acremonium* e 20 g/l para cefalosporina C pura.

2.2.3.2. Interações cefalosporina C - amberlite XAD-2

Para a análise teórica do procedimento de adsorção é necessário ter conhecimento da natureza das interações entre adsorvente e adsorbato.

Segundo CHAUBAL *et alii* (1995) a cefalosporina C é hidrofílica e quimicamente anfotérica, não podendo ser extraída de um meio de fermentação por solventes orgânicos, sendo que sua afinidade com adsorventes não-polares depende do pH.

Apesar das resinas de copolímero estireno - divinilbenzeno permitirem o uso de fases móveis a qualquer pH, a instabilidade das cefalosporinas em meios fortemente ácidos ou alcalinos limita o pH à faixa de 2.7 - 7.5 (SALTO & PRIETO, 1981).

Conforme KIRKBY *et alii* (1986) em baixo pH a dissociação do grupo ácido é suprimida, acentuando a interação hidrofóbica da cefalosporina C com adsorventes não - polares. Em pH 3, a decomposição da cefalosporina C é lenta o suficiente para não afetar os experimentos de equilíbrio.

A cefalosporina C é adsorvida sobre adsorventes aromáticos com uma afinidade 17 vezes maior que a adsorção sobre adsorventes éster alifáticos (Amberlite XAD-7), sugerindo uma interação específica entre a cefalosporina C e a superfície de um adsorvente aromático. Essa interação pode envolver as regiões planares das moléculas do antibiótico e os anéis benzênicos do adsorvente (CHAUBAL *et alii*, 1986).

O modelo molecular proposto por CHAUBAL *et alii* (1986) para elucidar as interações antibiótico - resina, considerando a configuração de mínima energia para o complexo cefalosporina C - benzeno, é mostrado na figura 2.3.

De acordo com KRSTULOVIC & BROWN (1982) as interações entre a fase estacionária não-polar e o soluto não-polar são fracas e não-seletivas (forças de dispersão de

van der Waals), sendo que a repulsão entre o soluto e a fase polar móvel, mais que as interações não-polares entre o soluto e a fase não-polar estacionária, é a responsável pela associação entre o soluto e a fase estacionária.

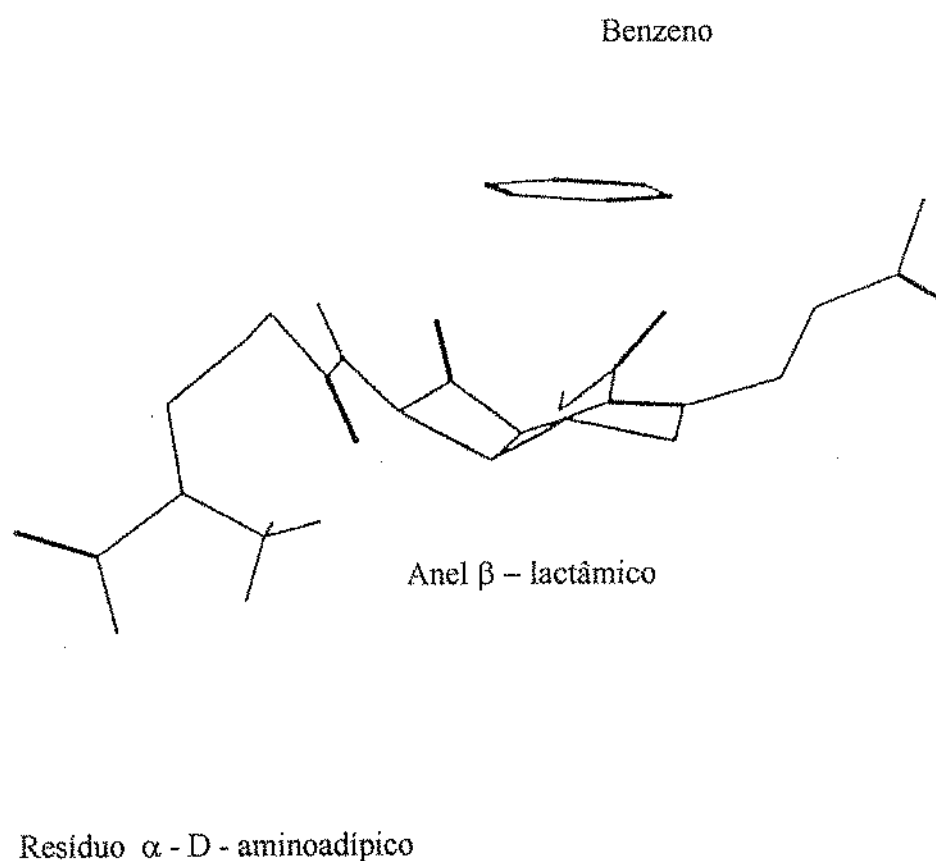


Figura 2.3: Configuração de mínima energia para o complexo cefalosporina C - benzeno.
Fonte: CHAUBAL *et alii* (1986).

2.2.3.3. Fatores envolvidos no desempenho da cromatografia de adsorção

Os fatores químicos e físicos envolvidos no procedimento cromatográfico podem ser listados como segue (VOSER, 1982):

- ♦ **Afinidade do produto a ser recuperado:** a afinidade é determinada por sua polaridade nas condições operacionais, variando de uma adsorção muito intensa à migração lenta do soluto através da coluna;
- ♦ **Solvente:** a água, em geral, é o melhor solvente para obter-se a máxima atividade da resina;
- ♦ **Concentração do produto na solução:** a capacidade da resina tende a aumentar com o aumento da concentração da solução de alimentação;
- ♦ **Composição da solução de alimentação:** determina em grande parte a capacidade da resina, porque os metabólitos solúveis e constituintes não fermentados do meio nutritivo, com a mesma ou maior afinidade do produto pela resina, reduzem sua capacidade;
- ♦ **pH:** é um fator muito importante na determinação da capacidade e seletividade da resina, pois ácidos e bases na forma não-dissociada são mais fortemente adsorvidos que os respectivos sais;
- ♦ **Presença e concentração de eletrólitos inorgânicos:** ácidos, bases e sais neutros aumentam a afinidade de resinas não-polares por solutos orgânicos;
- ♦ **Temperatura:** o efeito da temperatura não é pronunciado, no entanto temperaturas mais elevadas tendem a favorecer a dessorção e temperaturas mais baixas favorecem a adsorção;

Quanto à resina, sua capacidade está relacionada à superfície específica, portanto a distribuição do tamanho dos poros é determinante dessa capacidade. A seletividade da resina está relacionada à geometria tridimensional dos poros e suas características hidráulicas ao tamanho das partículas.

Fatores técnicos, como velocidade superficial e geometria da coluna, também devem ser considerados.

Segundo CHASE (1984) a força de interação entre as moléculas adsorvidas e o adsorvente deve ser facilmente reduzida quando requerido, para as moléculas serem facilmente eluídas. As substâncias orgânicas ou inorgânicas que alteram a polaridade do produto adsorvido, por exemplo por formação de sais ou que possuam maior afinidade com a resina, são possíveis eluentes.

A temperatura na eluição deverá ser a maior possível, sendo limitada pela estabilidade térmica do produto.

Na regeneração, a solubilidade das impurezas e sua afinidade com a resina devem ser considerados, sendo bastante usadas soluções aquosas ácidas ou básicas de álcoois e compostos carbonílicos de baixo peso molecular. O procedimento para regeneração deve ser simples e de curta duração.

2.2.4. Processos de Purificação de Cefalosporina C

O carvão ativado foi o primeiro material utilizado como adsorvente para purificação de cefalosporina C, mas sua baixa especificidade tornou sua utilização pouco atrativa (DECHOW, 1989). Além disso, a eluição requereu volumes de água de lavagem e eluente muito altos e, conforme comentado por VOSER (1982), a regeneração do carvão ativado para esse caso foi limitada.

No estudo desenvolvido por SALTO & PRIETO (1981) a octadecil-sílica mostrou-se mais apropriada para separações cromatográficas de cefalosporinas que as colunas de copolímero estireno - divinilbenzeno. Contudo, devido ao relativo baixo custo das resinas não-iônicas e às condições de adsorção e eluição, estas têm maior aplicação nos processos de purificação de cefalosporina C.

VOSER (1973), citado por DECHOW (1989), desenvolveu um processo de purificação de cefalosporina C por adsorção em colunas cromatográficas.

O meio de cultura foi primeiramente acidificado a pH 3 com ácido sulfúrico ou ácido oxálico, para promover a precipitação de proteínas e para melhorar a eficiência da adsorção, bem como destruir a penicilina N. Após, o meio foi filtrado, eliminando o micélio e outros componentes da solução nutritiva.

A purificação preliminar usando resina Amberlite XAD-2 permitiu recuperar, na eluição com acetona a 20 %, 80 % do antibiótico obtido na fermentação e menos de 20 % das impurezas iniciais. A vazão foi de 1 volume de leito por hora para uma coluna de 76 cm de comprimento.

O mesmo autor comenta que a eluição com 1/2 volume de leito de água deionizada e 1/2 volume de leito de solução aquosa de isopropanol a 10 % resultou em 95 % de recuperação da cefalosporina C.

A regeneração da coluna foi feita com 1 volume de leito de solução aquosa de metanol a 50 %, seguida por lavagem com água.

O efluente tornou-se a alimentação de uma coluna com resina aniônica na forma acetato (Amberlite IRA-68). A eluição nesta coluna foi feita com solução tampão de acetato de piridina a pH 5,5-5,6, com 95 % de recuperação, conseguindo-se a separação de impurezas com nenhuma ou muito forte afinidade com a resina (caso da desacetilcefalosporina C). Como alternativa, poderia-se usar acetato de sódio ou potássio. A regeneração da coluna foi feita com hidróxido de sódio.

STABLES & BRIGGS (1980), citados por DECHOW (1989), propõem o uso de uma resina catiônica (IRC-84), usada para diminuir o pH da alimentação sem a adição de ânions, trocando íons H^+ por cátions inorgânicos. Uma resina aniônica (Amberlite IRA-94) foi usada para adsorver ânions mais fortes, enquanto uma segunda resina aniônica (Amberlite IRA-68) adsorveu o antibiótico, que foi eluído com solução tampão de acetato de potássio.

A separação de cefalosporina C com diversos adsorventes poliméricos foi estudada por diferentes autores: resinas Amberlite IRA-68, XAD-4 e XAD-1180, e Diaion HP-20 (HICKETIER & BUCHHOLZ, 1989); Amberlite XAD-2 funcionalizada (CASSILAS *et alii*, 1993); Amberlite XAD-16 e Amberchron CG-161 (FIROUZTALE *et alii*, 1994).

YANG *et alii* (1994) estudaram a extração de cefalosporina C do meio de cultivo através de um sistema aquoso de duas fases polietilenoglicol (PEG)/sais, verificando o efeito da adição de diferentes tipos de solventes e sais, concentrações de sais, pH e peso molecular do polietilenoglicol sobre o coeficiente de partição de cefalosporina C e desacetilcefalosporina C, a fim de encontrar um sistema de extração adequado. Observaram que seria necessário um grande número de estágios de extração para eficiente separação da cefalosporina C e desacetilcefalosporina C, pois a eficiência não foi boa para um único estágio (63,2% de recuperação), usando-se o sistema 20 % de PEG-600, 20 % de sulfato de amônio e 1 % de KSCN. Também a força centrífuga necessária para separação de fases foi muito alta, e haveria necessidade de recuperação de PEG e sais para reciclo, visando reduzir os custos dos insumos químicos.

ANDRISANO *et alii* (1976) comentam que é possível modificar quimicamente a cefalosporina C para extraí-la com solvente orgânico. O objetivo é suprimir a característica básica do grupo amino da cadeia lateral, resultando em ácidos dibásicos que são solúveis em solventes orgânicos a baixo pH. A reação da cefalosporina C com um apropriado cloreto de sulfonila (solução em acetona 1 M, pH 8-10) resulta em ésteres que podem ser extraídos por metil isobutil cetona, acetato de etila ou n-butanol, sendo que o derivado pode ser transformado em ácido 7-aminocefalosporâmico. Neste trabalho, foi obtido o derivado N-tosilcefalosporina C com rendimento médio na extração de 88 %. Devido à formação de compostos contendo grupos sulfonamida, resultantes de reações entre os constituintes do meio e cloreto de sulfonila, a pureza obtida foi de 45 %, o que tornou necessário a purificação em colunas com resinas trocadoras de íons.

HANO *et alii* (1992) proporam o uso de extração reativa para purificação de cefalosporina C, que consiste na extração acompanhada de reação química com o agente extrator, insolúvel em água. A extração envolveu a reação por troca aniônica da cefalosporina C com cloreto de tri - n - octilmetilamônio (Aliquat-336) em acetato de n - butila (pH 10), com 80 % de recuperação da cefalosporina C. A reextração por solução tampão de acetato (pH 4) recuperou 60 - 70 % do antibiótico, não havendo decomposição do mesmo.

Devido à natureza do meio de fermentação, processos de purificação combinando etapas de separação por membrana e por cromatografia têm sido sugeridos.

LEE *et alii* (1992), citados por GOSH *et alii* (1996), proporam uma combinação de ultrafiltração, cromatografia em coluna, osmose reversa e secagem por "spray-dryer".

Na etapa de purificação por cromatografia usou-se uma resina aniônica fracamente básica (Diaion WA-30), adsorventes poliaromáticos neutros (Diaion HP-20 e Amberlite XAD-2) e resina catiônica fortemente ácida (Diaion SK-1B), dispostas em colunas sequenciais, com uma eficiência de recuperação em torno de 90 %. O produto final foi preparado por secagem em "spray-dryer", com a alimentação contendo 85,5 % de cefalosporina C, 6,3 % de água, 4,63 % de íons sódio livres e traços de íons metálicos.

Em outro estudo, KALYANPUR *et alii* (1985), citados por GOSH *et alii* (1996), desenvolveram um processo de purificação de cefalosporina C produzida por *Acremonium chrysogenum* ATCC 48272. As células foram primeiramente removidas por microfiltração tangencial em membrana de fluoreto de polivinilidina de 0,45 μm e, em seguida, proteínas, polissacarídeos e pigmentos foram removidos por ultrafiltração usando membrana de polisulfona 10KMWCO. O permeato foi concentrado por osmose reversa e o antibiótico purificado por HPLC (High Performance Liquid Chromatography), com recuperação de 98,5% e pureza de 93 %.

2.3. Teoria da Adsorção em Leito Empacotado

2.3.1. Isotermas de Adsorção

BROCKLEBANK (1990) afirma que, nos processos de adsorção, a taxa que o soluto liga-se à superfície sólida deve exceder a taxa na qual o soluto deixa a superfície. Pode-se assumir que essas taxas são dependentes da concentração do soluto na solução e na superfície do sólido e curvas experimentais para determinar as constantes dessas relações são essenciais para predizer o comportamento de uma coluna de adsorção. Tais curvas são denominadas isotermas de adsorção.

Isotermas de adsorção são usadas para representar os pontos de equilíbrio do soluto adsorvido sobre a superfície como uma função da concentração de soluto na solução. No



equilíbrio, a taxa de soluto sendo adsorvido na superfície é igual à taxa de soluto que deixa a superfície (DECHOW, 1989).

A isoterma de adsorção é uma parte essencial da modelagem da cinética de adsorção e, portanto, do projeto da coluna e sua eficiência. A isoterma revela a quantidade de adsorvente requerida e a sensibilidade do processo de adsorção quanto à concentração do soluto.

Isotermas de adsorção típicas são mostradas na figura 2.4, de acordo com BELTER *et alii* (1988). A abscissa dá a concentração do soluto na solução (**C**), usualmente em unidade de massa de soluto por volume de solução. A ordenada dá a concentração de soluto na superfície do adsorvente (**Q**), expressa como massa de adsorvato por volume de fase sólida do adsorvente. Uma isoterma côncava em relação à abscissa é favorável, e forte adsorção ocorre mesmo em soluções diluídas. Uma isoterma côncava em relação à ordenada é descrita como não-favorável.

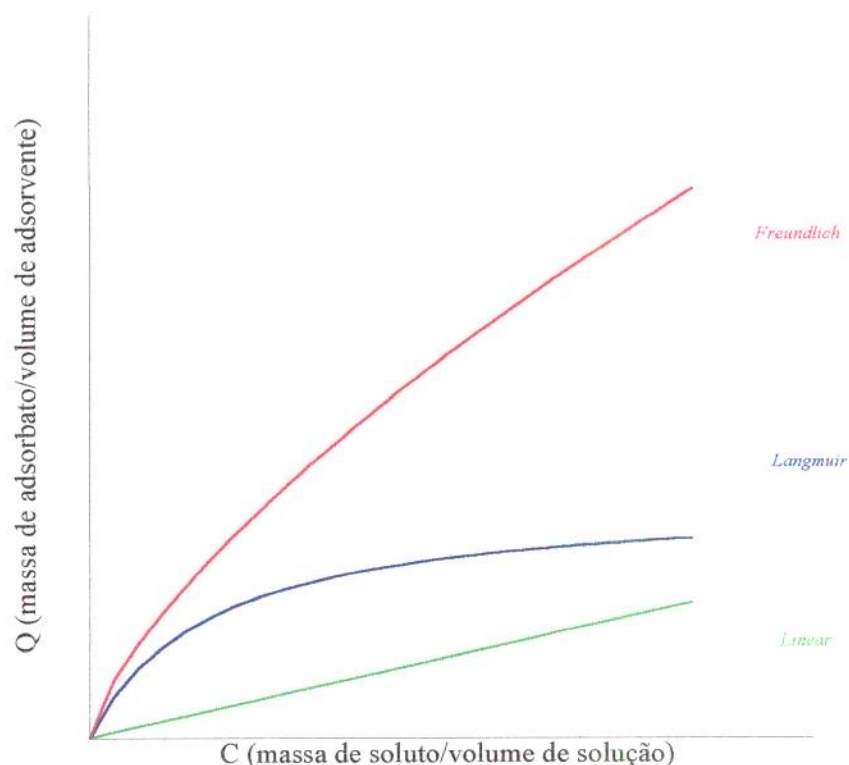


Figura 2.4: Isotermas de adsorção. “C” é a concentração de adsorvato na solução. “Q” é a concentração de adsorvato na superfície do adsorvente. Fonte: Belter *et alii* (1988).

GOSLING *et alii* (1989) comentam que as equações mais usadas para descrever fenômenos de adsorção são as de Langmuir e de Freundlich.

A isoterma linear é dada por:

$$Q = k C \quad (2.1)$$

A isoterma de Freundlich descreve a adsorção de uma grande variedade de antibióticos, esteróides e hormônios, no entanto só é válida para soluções diluídas e não prediz a linearidade quando a concentração tende a zero. Devido à sua simplicidade, é uma das equações mais usadas para correlação de dados de adsorção. A equação (2.2) descreve esta isoterma.

$$Q = k_f C^{1/n} \quad (2.2)$$

GOSLING *et alii* (1989) mencionam que a isoterma de Langmuir foi inicialmente proposta para descrever a adsorção de gases sobre superfícies, mas pode ser aproximada para muitos sistemas, sendo bastante usada para descrever adsorção por afinidade e troca iônica de íons monovalentes. Esta isoterma considera um número finito de sítios ativos na superfície do sólido e a inexistência de interações soluto-soluto, resultando em uma monocamada de material adsorvido.

Segundo MOORE (1976) e ATKINS (1986) o modelo de Langmuir considera que a habilidade das partículas em ligar-se aos sítios da superfície independe do fato de sítios próximos estarem ou não ocupados.

A isoterma de Langmuir é expressa pela equação (2.3):

$$Q = \frac{Q_m C}{K_d + C} \quad (2.3)$$

ATKINS (1986) comenta que a isoterma de Langmuir ignora a possibilidade que a camada inicial de material adsorvido possa agir como adsorvente. Caso contrário, pode-se esperar que a curva aumente indefinidamente, não tendendo à saturação. É o que propõe o modelo multicamadas de Brunauer, Emenet e Teller (Modelo BET).

KIRKBY *et alii* (1986), determinando parâmetros para cromatografia de fase reversa com cefalosporina C, tendo Amberlite XAD-2 como adsorvente, verificaram que a variação do pH de 3 para 7 diminuiu substancialmente o valor de k_f da isoterma de Freundlich, enquanto n foi pouco afetado. O valor de k_f foi de 12,06 para pH 3 e 1.99 para pH 7.

WEISENBERGER (1987), citado por GOSLING *et alii* (1989), mostrou que as isotermas de adsorção da cefalosporina C e desacetilcefalosporina C sobre Amberlite XAD-2 podiam ajustar-se às isotermas de Langmuir, Freundlich e linear, dependendo do pH de adsorção.

HICKETIER & BUCHHOLZ (1989) investigaram a cinética e equilíbrio de adsorção da cefalosporina C em diferentes adsorventes comerciais, a 28 °C, na faixa de concentração de 10 a 25 g/l. No caso da resina de troca iônica IRA - 68, correspondeu à forma da isoterma de Langmuir. As resinas não-polares de poliestireno - divinilbenzeno Amberlite XAD - 4, Amberlite XAD - 1180 e Diaion HP - 20 não se ajustaram bem aos modelos de Freundlich e Langmuir, seguindo o modelo multicamadas de Brunauer, Emmett e Teller (modelo BET).

CASSILAS *et alii* (1993), estudando a modelagem da adsorção de cefalosporina C em XAD - 2 - CH₂ - CH₂ - Br, em meio de pH 2,8 e temperatura de 293,16 K, verificaram um comportamento linear da isoterma de adsorção, com $Q = 0,150C$, na faixa de concentração de 0 a 2,5 g/l.

FIROUZTALE *et alii* (1994), no estudo da adsorção de cefalosporina C (sal de potássio) em resinas poliméricas, determinaram as isotermas de equilíbrio para Amberlite XAD - 16 em três diferentes diâmetros de partícula (84, 310 e 410 µm), num meio de pH 2,5 contendo 3,5 % de cloreto de sódio, para a faixa de concentração de cefalosporina C de 0,1 a 40 mg/ml. Os dados experimentais ajustaram-se bem à isoterma de Langmuir, e as isotermas foram idênticas, devido as resinas apresentarem composição química, porosidade e área superficial similares. A capacidade máxima da resina foi de 132 mg/ml de resina úmida e o valor da constante de Langmuir foi de 4,88 mg/ml

2.3.2. Curvas de Ruptura (“Breakthrough Curves”)

Em colunas de leito fixo, a adsorção do soluto no adsorvente pode ser descrita pelas curvas de ruptura, obtidas experimentalmente.

Neste experimento, é admitido que o soluto é aplicado à coluna com concentração constante, e o leito está sem material adsorvido. A concentração na saída da coluna é medida em função do tempo, como mostrado esquematicamente na figura 2.5.a. Esta concentração é inicialmente zero e permanece pequena por certo tempo, pois a maior parte do soluto é adsorvida. Em seguida, aumenta abruptamente, eventualmente atingindo a concentração de alimentação. Quando este aumento brusco ocorre, ou ruptura, o fluxo é interrompido. O material adsorvido é então eluído, por lavagem do leito com água a um determinado pH ou com um solvente específico.

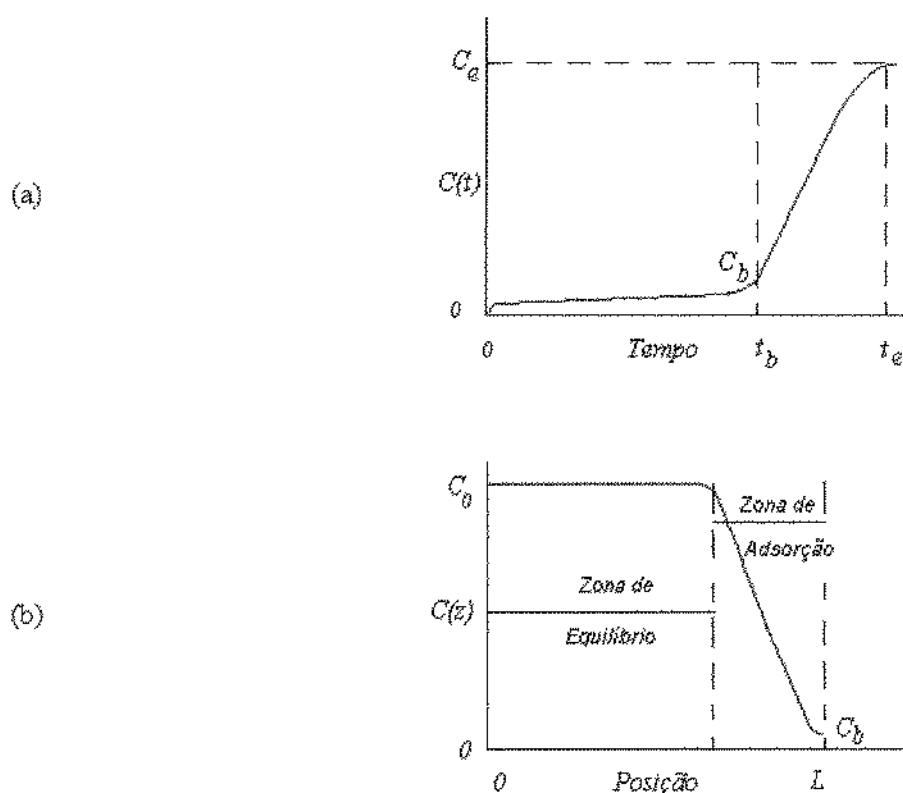


Figura 2.5: (a) Curva de ruptura para adsorção em coluna de leito fixo. “ C_b ” é a concentração de ruptura. (b) Perfil de concentração ao longo da coluna no tempo de ruptura(t_b). Fonte: Belter *et alii* (1988).

Para caracterizar esta curva, escolhe-se duas concentrações : a concentração de ruptura C_b , representa o máximo que pode-se descartar; a concentração de exaustão C_e , correspondente à concentração no eluente quando o leito é julgado ineficaz. Essas duas concentrações são arbitrárias, sugerindo-se C_b e C_e como 10 e 90 % da concentração de alimentação (C_0), respectivamente.

Segundo FOUST *et alii* (1982) esta representação gráfica da concentração de saída em função do tempo é bastante semelhante à representação gráfica em pontos ao longo do leito, durante o ciclo de adsorção.

Na figura 2.5.b é mostrado o comportamento da concentração de soluto ao longo da coluna, no tempo de ruptura. A zona de equilíbrio é onde o leito está saturado. Esta zona existe de $Z = 0$ a $Z = L(1 - \Delta t/t_b)$, onde $\Delta t = t_e - t_b$. Na zona onde ocorre adsorção tem-se $L\Delta t/t_b$, sendo que o soluto está sendo transferido da solução de alimentação para o adsorvente. Essa zona de transferência de massa move-se regularmente ao longo da coluna, mantendo o mesmo perfil.

A análise do processo é complexa, devido à adsorção não-linear instável, consequência da não-homogeneidade no leito fixo de partículas, este de difícil reprodutibilidade.

A influência da forma da curva de ruptura no desempenho da adsorção em leitos fixos é mostrada na figura 2.6. A capacidade total dos leitos é a mesma em ambos os casos. As áreas hachuradas indicam a quantidade de adsorvato retido no leito para $C/C_0 = 0,1$, portanto a capacidade da coluna utilizada. Observa-se que a curva “b”, com melhor desempenho, apresenta-se íngreme. Conforme FOUST *et alii* (1982) o coeficiente angular é uma função da velocidade de adsorção, sendo que um soluto que é adsorvido muito rapidamente resulta em uma curva quase vertical, aproximando-se de uma função degrau.

A capacidade máxima da coluna para uma dada concentração de entrada é igual à área acima da curva de ruptura e a quantidade de soluto remanescente no efluente é igual à área abaixo da curva. SRIDHAR *et alii* (1994) definem, com propósitos de comparação, duas eficiências:

♦ eficiência de recuperação do soluto = $S_1/(S_1 + S_2)$

♦ eficiência de utilização do leito = $S_1/(S_1 + S_3)$

sendo:

S_1 : capacidade usada da coluna (área acima da curva até a ruptura)

S_2 : soluto perdido no efluente (área abaixo da curva até a ruptura)

S_3 : capacidade da coluna não utilizada (área acima da curva após a ruptura)

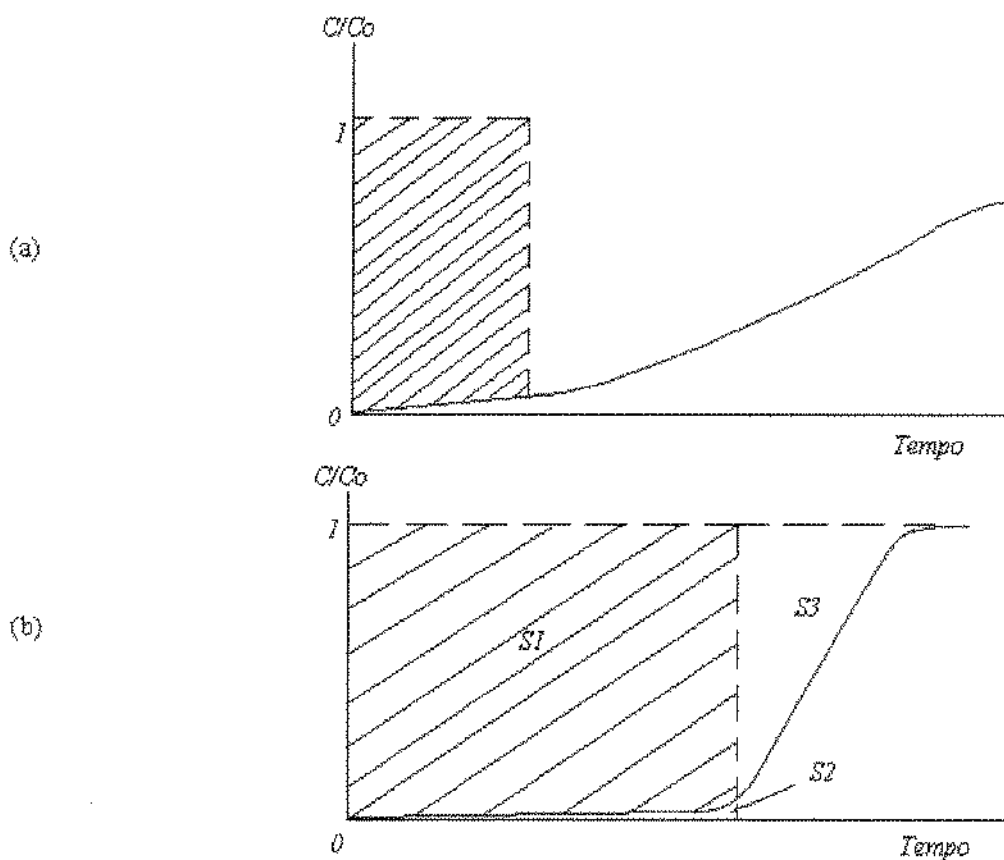


Figura 2.6: Influência do formato da curva de ruptura no desempenho de colunas de leito fixo. A área hachurada mostra a quantidade de adsorvato que seria adsorvido na coluna, se o carregamento terminasse quando C/C_0 atinge o valor de 0,1. (a) Tipo de curva obtida em coluna empacotada. (b) Curva com inclinação mais acentuada, obtida na mesma coluna, com alteração das condições operacionais. Fonte: Chase (1984).

Conforme CHASE (1984) é importante considerar os fatores que influem na forma e posição da curva de ruptura na análise da adsorção em leito fixo.

FIROUZTALE *et alii* (1994) estudaram o efeito do tamanho de partícula da resina, altura do leito e velocidade de alimentação sobre a dinâmica da adsorção da cefalosporina C em coluna de leito fixo. Observaram que, quando o diâmetro das partículas de resina foi reduzido, a inclinação da curva de ruptura tornou-se mais acentuada e o tempo de ruptura (1% da concentração de alimentação) mais longo. As eficiências mais elevadas foram obtidas para resina XAD-16 de 84 e 116 μm , em colunas de 12,5 cm, velocidade de 573 cm/h e concentração de alimentação de 10 mg/ml. No entanto, a perda de carga foi demasiadamente alta. Quanto à altura do leito, com o aumento desta melhorou a capacidade de adsorção, pois a fração da coluna que não estava saturada, quando a ruptura ocorria, diminuiu. Observaram também que a alta eficiência (0,80) em colunas de 75 cm, combinada com baixa perda de carga, fez da resina XAD-16 com 310 μm a melhor para a adsorção da cefalosporina C.

SRIDHAR *et alii* (1994) consideraram importantes o efeito da dispersão axial, concentração do soluto, cinética de adsorção, porosidade da partícula, tamanho da partícula e velocidade de escoamento sobre a curva de ruptura, para uma coluna empacotada com partículas porosas.

2.3.3. Modelagem Matemática

As principais teorias que elucidam a cromatografia são a teoria dos pratos e a teoria das taxas.

De acordo com LI *et alii* (1994), na teoria dos pratos, a coluna cromatográfica é considerada como uma sucessão de estágios, nos quais um volume finito de fase móvel move-se de um estágio a outro, sendo que o equilíbrio é atingido em cada estágio. Assume-se que o conteúdo em cada elemento está completamente misturado, sendo análogo a um modelo de contactores ideais em série, descritos por equações diferenciais ordinárias de primeira ordem.

A vantagem da teoria dos pratos é sua capacidade de descrever o perfil de eluição, forma e resolução dos picos, e zona de migração. No entanto, falha em prever a altura e o número dos pratos, bem como a contribuição quantitativa da cinética do processo.

Um modelo de taxas consiste de um conjunto de equações de balanço de massa e apropriadas condições de contorno. Estes modelos podem considerar dispersão axial, transferência de massa externa, difusão intraparticular, isothermas não-lineares e cinética da adsorção (LI *et alii*, 1994).

Os mecanismos envolvidos na adsorção são ilustrados na figura 2.7. Segundo FIROUZTALE *et alii* (1992), eles correspondem a:

- ♦ **Transferência de moléculas através de um filme líquido estagnado;**
- ♦ **Difusão dentro dos poros;**
- ♦ **Adsorção/dessorção na superfície;**
- ♦ **Difusão de pequenas moléculas para a fase sólida;**

Estes mecanismos podem ser incorporados a um modelo matemático, que é validado por sua habilidade em prever as curvas de ruptura.

CRITTENDEN & HAND (1984), citados por DECHOW (1989), mencionam que um modelo matemático auxilia o projeto de uma unidade de purificação em escala industrial, predizendo o impacto de mudanças nos parâmetros do processo sobre o desempenho de uma unidade de adsorção. O modelo requer que o adsorvente esteja uniformemente empacotado, com partículas porosas esféricas e de tamanho uniforme; que a taxa de alimentação, a temperatura de alimentação e a temperatura do adsorvente sejam constantes; que a temperatura de alimentação e temperatura do adsorvente sejam iguais; que o fluxo seja uniformemente distribuído no topo do leito sem caminhos preferenciais, com gradiente de concentração na direção radial negligenciável; e que não ocorram mudanças de fase ou reações químicas no leito.

CASSILAS *et alii* (1993) desenvolveram um modelo matemático para adsorção de cefalosporina C em tanque agitado, envolvendo transferência de massa externa, transferência de massa nos poros da partícula e isoterma de adsorção linear.

FIROUZTALE *et alii* (1994) proporam um modelo matemático para adsorção de cefalosporina C em resinas poliméricas em uma coluna de leito fixo, que considerou a transferência de massa em um filme líquido, dispersão axial, difusão nos poros e adsorção seguindo a isoterma não-linear de Langmuir.

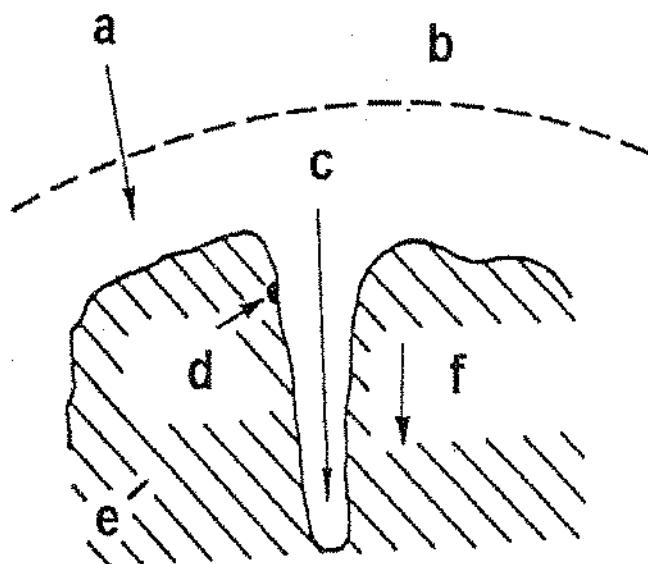


Figura 2.7: Mecanismos envolvidos em uma cromatografia. (a) Transferência de massa através do filme líquido. (b) Meio líquido. (c) Difusão nos poros. (d) Adsorção/dessorção. (e) Partícula. (f) Difusão na fase sólida. Fonte: Firouztale *et alii* (1992).

2.4. Comentários

Como pôde ser observado neste capítulo, a adsorção cromatográfica é largamente citada na literatura como etapa fundamental da purificação de cefalosporina C, estando presente mesmo em propostas recentes de processos alternativos, sendo várias resinas mencionadas nestes estudos.

Quanto à modelagem matemática da separação, tanto em coluna de leito fixo como em tanque agitado, observou-se que são baseadas na teoria de transferência de massa, diferindo-se quanto aos métodos de resolução propostos. No entanto, observou-se pouca disponibilidade de dados experimentais da separação de cefalosporina C em coluna de leito fixo, e, conseqüentemente, modelos matemáticos validados.

No próximo capítulo é desenvolvido o modelo matemático para separação de cefalosporina C em coluna de leito fixo, descrevendo-se os métodos de resolução empregados e o programa computacional obtido para simulação das curvas de ruptura.

3. MODELAGEM MATEMÁTICA

Neste capítulo será desenvolvido, através de balanços de massa, o modelo matemático de separação de cefalosporina C em coluna de leito fixo contendo partículas porosas (Amberlite XAD-2). Os balanços de massa consideram a adsorção externa e interna à partícula, com a cinética de adsorção seguindo a isoterma de Langmuir. Também serão indicados os métodos de resolução empregados, bem como o diagrama em blocos do programa computacional para a simulação das curvas de ruptura em coluna de leito fixo.

3.1. Cinética da Adsorção

Pode-se representar o mecanismo de adsorção-dessorção pela equação (3.1).



Na equação (3.1), k_1 e k_2 são as constantes cinéticas da adsorção, e define-se $K_d = k_2/k_1$ como a constante de dissociação que descreve o equilíbrio da adsorção. C , A e Q correspondem, respectivamente, a cefalosporina C a ser adsorvida, os sítios livres do adsorvente (resina Amberlite XAD-2) e o complexo cefalosporina C - adsorvente.

A expressão cinética para adsorção da cefalosporina C em resina descrita pela equação (3.1) é dada por:

$$\frac{\partial Q}{\partial t} = [k_1 C_r (Q_m - Q) - k_2 Q] \quad (3.2)$$

C_r é a concentração de cefalosporina C em solução no poro da partícula que pode ser adsorvida, Q é a massa de cefalosporina C adsorvida na resina por unidade de volume de fase sólida da partícula e Q_m é a capacidade máxima de adsorção do adsorvente, expressa como massa de cefalosporina C adsorvida por volume de fase sólida de partícula.

No equilíbrio tem-se:

$$\frac{\partial Q}{\partial t} = k_1 C_r^* (Q_m - Q^*) - k_2 Q^* = 0 \quad (3.3)$$

O símbolo (*) representa o valor da variável no equilíbrio.

No equilíbrio, rearranjando os termos da equação (3.3), observa-se que a concentração de material adsorvido na resina varia com a concentração de material em solução da seguinte forma:

$$Q^* = \frac{Q_m C_r^*}{K_d + C_r^*} \quad (3.4)$$

A equação (3.4) representa a isoterma de equilíbrio para a adsorção da cefalosporina C em Amberlite XAD-2, correspondente à isoterma de Langmuir.

A equação diferencial (3.2) foi resolvida através do método numérico de Runge-Kutta de 4ª ordem. O algoritmo do método é descrito abaixo, conforme CHAPRA & CANALE (1990).

$$y_{i+1} = y_i + \left[\frac{1}{6} (k_1 + 2k_2 + 2k_3 + k_4) \right] h \quad (3.5)$$

Sendo:

$$k_1 = f(x_i, y_i) \quad (3.6)$$

$$k_2 = f\left(x_i + \frac{1}{2}h, y_i + \frac{1}{2}hk_1\right) \quad (3.7)$$

$$k_3 = f\left(x_i + \frac{1}{2}h, y_i + \frac{1}{2}hk_2\right) \quad (3.8)$$

$$k_4 = f(x_i + h, y_i + hk_3) \quad (3.9)$$

h é o incremento ou passo da variável tempo e x_i e y_i os valores das variáveis no tempo t_i .

Para o volume diferencial de controle (VDC) indicado na Figura 3.1, o balanço de massa global foi descrito conforme abaixo:

[cefalosporina C que entra no (VDC) por convecção e difusão] - [cefalosporina C que sai do (VDC) por difusão e convecção] - [cefalosporina C adsorvida no (VDC)] = [acúmulo de cefalosporina C no (VDC)]

A equação do balanço de massa é dada por:

$$-u\varepsilon \frac{\partial C_m}{\partial Z} + E\varepsilon \frac{\partial^2 C_m}{\partial Z^2} - (1 - \varepsilon)(1 - \varepsilon_0)R_a = \varepsilon \frac{\partial C_m}{\partial t} \quad (3.10)$$

Na equação (3.10), R_a corresponde à taxa de adsorção de cefalosporina C no VDC e E é o coeficiente de dispersão axial.

Rearranjando os termos:

$$\frac{\partial C_m}{\partial t} = -u \frac{\partial C_m}{\partial Z} + E \frac{\partial^2 C_m}{\partial Z^2} - \left(\frac{1 - \varepsilon}{\varepsilon} \right) (1 - \varepsilon_0) R_a \quad (3.11)$$

Tem-se as seguintes condições iniciais e de contorno, com respeito a Q e C_m :

♦ **Condição inicial:**

$$t = 0, \quad 0 < Z \leq L, \quad C_m = 0 \quad (3.12)$$

$$t = 0, \quad 0 \leq Z \leq L, \quad Q = 0 \quad (3.13)$$

♦ **Condições de contorno:**

Na entrada da coluna:

$$t \geq 0, \quad Z = 0, \quad C_m = C_0 \quad (3.14)$$

$$t \geq 0, \quad Z = 0, \quad Q = 0 \quad (3.15)$$

Na saída da coluna:

$$Z = L, \quad \frac{\partial C}{\partial Z} = 0 \quad (3.16)$$

Considerando a resistência à transferência de massa entre o líquido e a superfície do adsorvente, sendo o regime permanente e o fenômeno governado por um modelo de película, caracterizado por um coeficiente de transferência de massa K_s , tem-se:

$$\frac{R}{3} R_c = J = K_s (C_m - C_{r,r,K}) \left(\frac{\varepsilon}{1-\varepsilon} \right) \left(\frac{1}{1-\varepsilon_0} \right) \quad (3.17)$$

Na equação (3.17), J é o fluxo de massa por unidade de área de partícula.

Substituindo a expressão de R_c na equação (3.11):

$$\frac{\partial C_m}{\partial t} = -u \frac{\partial C_m}{\partial Z} + E \frac{\partial^2 C_m}{\partial Z^2} - K_s (C_m - C_{r,r,K}) \quad (3.18)$$

O valor de K_s pode ser estimado pela correlação proposta por ARNOLD *et alii* (1985):

$$N_{Sh} = 2 + 1,45 N_{Re}^{1/2} N_{Sc}^{1/3} = \frac{K_s d_p}{D_m} \quad (3.19)$$

Na equação (3.19), define-se os números adimensionais como:

$$N_{Sh} = \frac{K_s d_p}{D_m} \quad (3.20)$$

$$N_{Sc} = \frac{\mu}{\rho D_m} \quad (3.21)$$

$$N_{Re} = \frac{\rho v d_p}{\mu} \quad (3.22)$$

D_m é a difusividade molecular da cefalosporina C, d_p é o diâmetro da partícula, v é a velocidade superficial, μ é a viscosidade da solução e ρ é a densidade da solução.

Fazendo-se na equação (3.18) as aproximações numéricas de Crank-Nicolson, conforme descrito por CHAPRA & CANALE (1990), tem-se:

$$\frac{\partial C_m}{\partial t} = \frac{C_{m,z,j+1} - C_{m,z,j}}{\Delta t} \quad (3.23)$$

$$\frac{\partial C_m}{\partial Z} = \frac{1}{2} \left[\frac{C_{m,z+1,j+1} - C_{m,z+1,j+1}}{2\Delta Z} + \frac{C_{m,z+1,j} - C_{m,z+1,j}}{2\Delta Z} \right] \quad (3.24)$$

$$\frac{\partial^2 C_m}{\partial Z^2} = \frac{1}{2} \left[\frac{C_{m,z+1,j} - 2C_{m,z,j} + C_{m,z+1,j}}{\Delta Z^2} + \frac{C_{m,z+1,j+1} - 2C_{m,z,j+1} + C_{m,z+1,j+1}}{\Delta Z^2} \right] \quad (3.25)$$

Nas equações (3.23), (3.24) e (3.25), z corresponde à posição axial e j ao tempo.

Substituindo as equações (3.23), (3.24) e (3.25) na equação (3.18), e reagrupando os termos, obtém-se a equação abaixo:

$$\begin{aligned} & - \left[\frac{u}{4\Delta Z} + \frac{E}{2(\Delta Z)^2} \right] C_{m,z+1,j+1} + \left[\frac{E}{(\Delta Z)^2} + \frac{1}{\Delta t} \right] C_{m,z,j+1} + \left[\frac{u}{4\Delta Z} - \frac{E}{2(\Delta Z)^2} \right] C_{m,z+1,j+1} = \\ & \left[\frac{u}{4\Delta Z} + \frac{E}{2(\Delta Z)^2} \right] C_{m,z+1,j} + \left[\frac{1}{\Delta t} - \frac{E}{(\Delta Z)^2} - \frac{3}{R} K_s \right] C_{m,z,j} + \left[\frac{E}{2(\Delta Z)^2} - \frac{u}{4\Delta Z} \right] C_{m,z+1,j} \\ & + \frac{3}{R} K_s C_{ri|r=R} \end{aligned} \quad (3.26)$$

Definindo-se:

$$\alpha = \frac{u}{4\Delta Z} + \frac{E}{2(\Delta Z)^2} \quad (3.27)$$

$$\beta = \frac{E}{(\Delta Z)^2} + \frac{1}{\Delta t} \quad (3.28)$$

$$\gamma = \frac{u}{4\Delta Z} - \frac{E}{2(\Delta Z)^2} \quad (3.29)$$

$$\delta = \frac{1}{\Delta t} - \frac{E}{(\Delta Z)^2} \quad (3.30)$$

Substituindo as expressões definidas em (3.27), (3.28), (3.29) e (3.30) na equação (3.26), tem-se a equação geral para a transferência de massa externa:

$$-\alpha C_{mz-1,j-1} + \beta C_{mz,j-1} + \gamma C_{mz+1,j-1} = \left(\delta - \frac{3}{R} K_s \right) C_{mz,j} - \gamma C_{mz+1,j} + \frac{3}{R} K_s C_r|_{r=R} \quad (3.31)$$

A equação (3.31) foi resolvida considerando um sistema tridiagonal, conforme proposto na equação (3.32), de acordo com o descrito por CHAPRA & CANALE (1990).

$$\begin{bmatrix} X_1 \\ X_2 \\ X_3 \\ \vdots \\ \vdots \\ \vdots \\ X_{n-1} \\ X_n \end{bmatrix} \begin{bmatrix} \beta_1 & \gamma_1 & & & & \\ \alpha_2 & \beta_2 & \gamma_2 & & & \\ & \alpha_3 & \beta_3 & \gamma_3 & & \\ & & \ddots & \ddots & \ddots & \\ & & & \ddots & \ddots & \\ & & & & \ddots & \\ & & & & & \alpha_{n-1} & \beta_{n-1} & \gamma_{n-1} \\ & & & & & & \alpha_n & \beta_n \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} r_1 \\ r_2 \\ r_3 \\ \vdots \\ \vdots \\ \vdots \\ r_{n-1} \\ r_n \end{bmatrix} \quad (3.32)$$

A resolução foi feita através do algoritmo de Thomas, conforme segue:

Para $k = 2$ até n , tem-se:

$$\alpha_k = \frac{\alpha_k}{\beta_{k-1}} \quad (3.33)$$

$$\beta_k = \beta_k - \alpha_k \gamma_{k-1} \quad (3.34)$$

$$r_k = r_k - \alpha_k r_{k-1} \quad (3.35)$$

$$X_n = \frac{r_n}{\beta_n} \quad (3.36)$$

Para $k = n-1$ até 1:

$$X_k = \frac{D_k - \lambda \cdot X_{k+1}}{\beta} \quad (3.37)$$

3.2.2. Transferência de Massa Interna à Partícula

Devido ao efeito difusional e à cinética de adsorção no interior do suporte, forma-se um perfil de concentração no interior da partícula porosa.

O balanço de massa de cefalosporina C no interior da partícula resulta na seguinte equação:

$$D_{ef} \left[\frac{\partial^2 C_r}{\partial r^2} + \frac{2}{r} \frac{\partial C_r}{\partial r} \right] - \frac{\partial Q}{\partial t} \left(\frac{1 - \varepsilon_p}{\varepsilon_p} \right) = \frac{\partial C_r}{\partial t} \quad (3.38)$$

D_{ef} é a difusividade efetiva.

Substituindo, na equação (3.38), a definição de $\frac{\partial Q}{\partial t}$ dada pela equação (3.2), tem-se:

$$\frac{\partial C_r}{\partial t} = \frac{2}{r} D_{ef} \frac{\partial C_r}{\partial r} + D_{ef} \frac{\partial^2 C_r}{\partial r^2} - (k_1 C_r (Q_m - Q) - k_2 Q) \left(\frac{1 - \varepsilon_p}{\varepsilon_p} \right) \quad (3.39)$$

Tem-se as seguintes condições de contorno:

$$\blacklozenge \quad r = 0, \quad \frac{\partial C_r}{\partial r} \Big|_{r=0} = 0 \quad (3.40)$$

$$\blacklozenge \quad r = R, \quad K_s (C_m - C_{r=R}) = D_{ef} \frac{\partial C_r}{\partial r} \Big|_{r=R} \quad (3.41)$$

Fazendo-se as aproximações numéricas segundo Crank-Nicolson, conforme descrito por CHAPRA & CANALE (1990), tem-se:

$$\frac{\partial C_r}{\partial t} = \frac{C_{r,i,j+1} - C_{r,i,j}}{\Delta t} \quad (3.42)$$

$$\frac{\partial C_r}{\partial r} = \frac{1}{2} \left[\frac{C_{r,i+1,j+1} - C_{r,i+1,j-1}}{2\Delta r} + \frac{C_{r,i+1,j} - C_{r,i-1,j}}{2\Delta r} \right] \quad (3.43)$$

$$\frac{\partial^2 C_r}{\partial r^2} = \frac{1}{2} \left[\frac{C_{r,i+1,j} + 2C_{r,i,j} + C_{r,i-1,j}}{\Delta r^2} + \frac{C_{r,i+1,j+1} - 2C_{r,i,j+1} + C_{r,i-1,j+1}}{\Delta r^2} \right] \quad (3.44)$$

Nas equações (3.42), (3.43) e (3.44), i indica a posição radial e j indica o tempo.

Substituindo as equações (3.42), (3.43), (3.44) na equação (3.39), e reagrupando os termos, tem-se:

$$\begin{aligned} & \left[\frac{D_{ef}}{2r\Delta r} + \frac{D_{ef}}{2(\Delta r)^3} \right] C_{r,i+1,j+1} + \left[\frac{1}{\Delta t} + \frac{D_{ef}}{\Delta r^2} \right] C_{r,i,j+1} + \left[-\frac{D_{ef}}{2r\Delta r} + \frac{D_{ef}}{2(\Delta r)^3} \right] C_{r,i-1,j+1} = \\ & \left[-\frac{D_{ef}}{2r\Delta r} + \frac{D_{ef}}{2(\Delta r)^3} \right] C_{r,i+1,j} + \left[\frac{1}{\Delta t} + \frac{D_{ef}}{\Delta r^2} + k_1(Q_m - Q_{i,j}) \left(\frac{1 - \varepsilon_p}{\varepsilon_p} \right) \right] C_{r,i,j} + \\ & \left[\frac{D_{ef}}{2(\Delta r)^3} + \frac{D_{ef}}{2r\Delta r} \right] C_{r,i-1,j} + k_2 Q_{i,j} \left(\frac{1 - \varepsilon_p}{\varepsilon_p} \right) \end{aligned} \quad (3.45)$$

Definindo-se os coeficientes, e considerando $r = \Delta r \cdot i$, sendo Δr o passo de r e i a posição radial:

$$\alpha_1 = -\frac{D_{ef}}{2r\Delta r} + \frac{D_{ef}}{2(\Delta r)^3} = \alpha_{1[i]} = \frac{D_{ef}}{2(\Delta r)^2} \left(1 - \frac{1}{i} \right) \quad (3.46)$$

$$\beta_1 = \frac{1}{\Delta t} + \frac{D_{ef}}{\Delta r^2} \quad (3.47)$$

$$\gamma_1 = -\frac{D_{ef}}{2r\Delta r} - \frac{D_{ef}}{2(\Delta r)^3} = \gamma_{1[i]} = \frac{D_{ef}}{2(\Delta r)^2} \left(\frac{1}{i} + 1 \right) \quad (3.48)$$

$$\delta_1 = \frac{1}{\Delta t} - \frac{Def}{\Delta r^2} \quad (3.49)$$

Substituindo as equações (3.46), (3.47), (3.48) e (3.49) em (3.45), tem-se a equação geral para transferência de massa interna, dada por:

$$\begin{aligned} -\alpha_{100}C_{ri-1,j+1} + \beta_1 C_{ri,j+1+1} + \gamma_{100}C_{ri+1,j+1} = \alpha_{100}C_{ri+1,j} + \left[\delta_1 + k_1(Q_m - Q_{i,j}) \left(\frac{1-\varepsilon_p}{\varepsilon_p} \right) \right] C_{ri,j} \\ - \gamma_{100}C_{ri-1,j} + k_2 Q_{i,j}^{1/n} \left(\frac{1-\varepsilon_p}{\varepsilon_p} \right) \end{aligned} \quad (3.50)$$

A resolução da equação (3.50) é feita através de matriz tridiagonal, de maneira análoga à proposta para a equação geral de transferência de massa externa.

As condições de contorno propostas resultam em:

$$\begin{aligned} \blacklozenge \quad r=0, \quad \frac{\partial C_r}{\partial r} = 0 \quad \Rightarrow \quad C_{ri-1,j} = C_{ri+1,j} \\ C_{ri-1,j+1} = C_{ri+1,j+1} \end{aligned} \quad (3.51)$$

$$\blacklozenge \quad r=R, \quad K_S(C_m - C_{ri=r=R}) = D_{ef} \frac{\partial C_r}{\partial r} \Big|_{r=R} \Rightarrow C_{ri+1,j} = \frac{2rK_S}{D_{ef}} (C_m - C_{ri=r=R}) + C_{ri-1,j} \quad (3.52)$$

3.3. Programação em Pascal

A partir do modelo matemático proposto para a separação de cefalosporina C em coluna de leito fixo, das condições de contorno e dos métodos de resolução indicados, desenvolveu-se um programa em linguagem PASCAL (Turbo Pascal 7.0, Borland) que permite a simulação das curvas de ruptura.

O diagrama em blocos do programa é mostrado na figura 3.2.

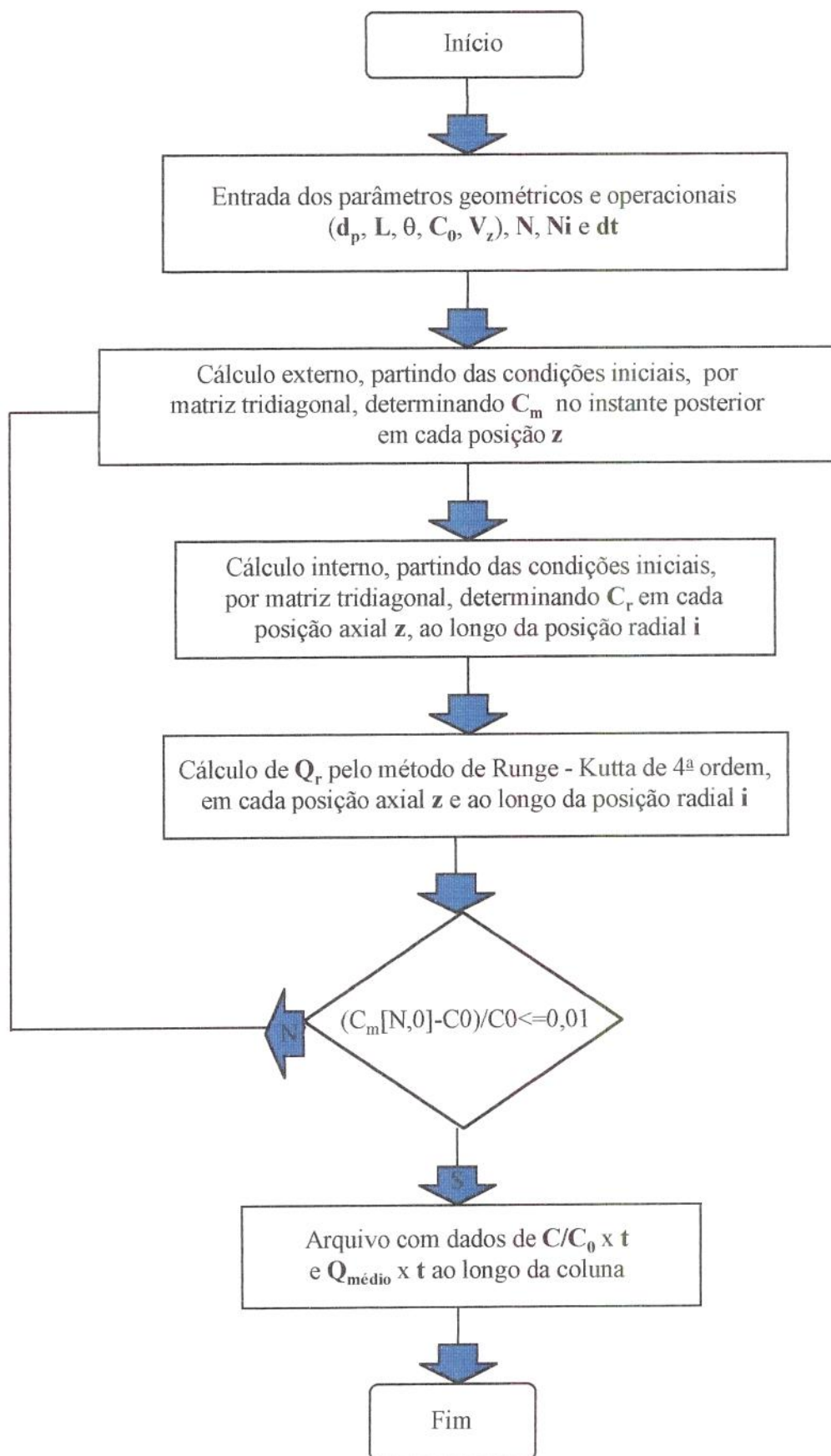


Figura 3.2: Diagrama em blocos do programa para simulação da separação de cefalosporina C em coluna de leito fixo. N é o número de pontos na coluna e N_i o número de pontos na partícula.

4. METODOLOGIA

Neste capítulo serão descritos os procedimentos experimentais utilizados no estudo da influência dos parâmetros geométricos e operacionais da coluna sobre o desempenho da separação de cefalosporina C por Amberlite XAD-2. Também será apresentada a metodologia desenvolvida para o ajuste dos parâmetros do modelo matemático proposto no capítulo anterior (método simplex modificado).

4.1. Ensaios Experimentais de Separação de Cefalosporina C em Coluna de Leito Fixo

4.1.1. Preparo da Resina Amberlite XAD-2

As propriedades da resina Amberlite XAD-2 estão indicadas na tabela 4.1.

Tabela 4.1: Propriedades físicas típicas do adsorvente Amberlite XAD - 2.

Propriedade	Valor
Aparência	Partículas Esféricas, Opacas e Resistentes
Sólidos (%)	55
Porosidade (ml poro/ml partícula)*	0,42
Área Superficial (m ² /g)*	300
Tamanho Efetivo (mm)	0,4
Diâmetro Médio do Poro (Å)*	90
Densidade Aparente (g/ml)	0,64
Densidade (resina úmida, g/ml)	1,02
Densidade (esqueleto, g/ml)	1,07

* Base seca.

Fonte: Rohm and Haas Company (1989).

Primeiramente, a resina Amberlite XAD-2 (Rohm & Hass Company) foi peneirada, usando-se as partículas retidas em malha de 0,210 mm, 0,297 mm e 0,500 mm.

Segundo KIRKBY *et alii* (1986), na produção de Amberlite XAD-2, monômeros residuais ficam retidos na estrutura porosa após a polimerização, sendo que interferem na determinação espectrofotométrica da concentração de cefalosporina C.

Para sua remoção, foi feita lavagem com metanol por extração Soxhlet (SALTO & PRIETO, 1981; KIRKBY *et alii*, 1986), seguida de lavagem com tampão ácido fórmico de pH 3,6, preparado conforme PERRIN (1963), para remoção do metanol.

4.1.2. Separação de Cefalosporina C em Coluna de Leito Fixo - determinação das curvas de ruptura

Os ensaios experimentais de separação de cefalosporina C em coluna de leito fixo foram conduzidos em coluna de vidro Pharmacia C 10/20, contendo resina Amberlite XAD-2, preparada conforme descrito no item 4.1.1. A coluna possui jaqueta termostatzada JC-10, para controle de temperatura por circulação de água a 25 °C, proveniente de um banho Tecnal TE-184, modelo 7553-60, acoplado à coluna através de um tubo de polietileno. A coluna tem 20 cm de comprimento e 1 cm de diâmetro interno, sendo que a altura do leito da resina pode ser ajustada através de um adaptador AC-10, que permite a distribuição uniforme da alimentação.

Para cada ensaio, a coluna foi equilibrada pela passagem de solução tampão de ácido fórmico (pH 3,6), em volume correspondente a 5 vezes o volume do leito de partículas.

A alimentação de uma solução de cefalosporina C “Sigma” (sal de zinco), em tampão ácido fórmico de pH 3,6, com concentração previamente estabelecida (0,06 g/l), foi feita através de uma bomba peristáltica Masterflex modelo nº 7524-10.

A concentração de cefalosporina C na saída da coluna foi determinada pela medida da absorbância a 260 nm, em espectrofotômetro UV-VIS Micronal, modelo B-382, acoplado a um registrador potenciométrico Micronal, modelo B-292.

Cada experimento foi conduzido até a concentração de saída manter-se constante ao longo do tempo, por duas horas.

A montagem experimental descrita é mostrada na figura 4.1.

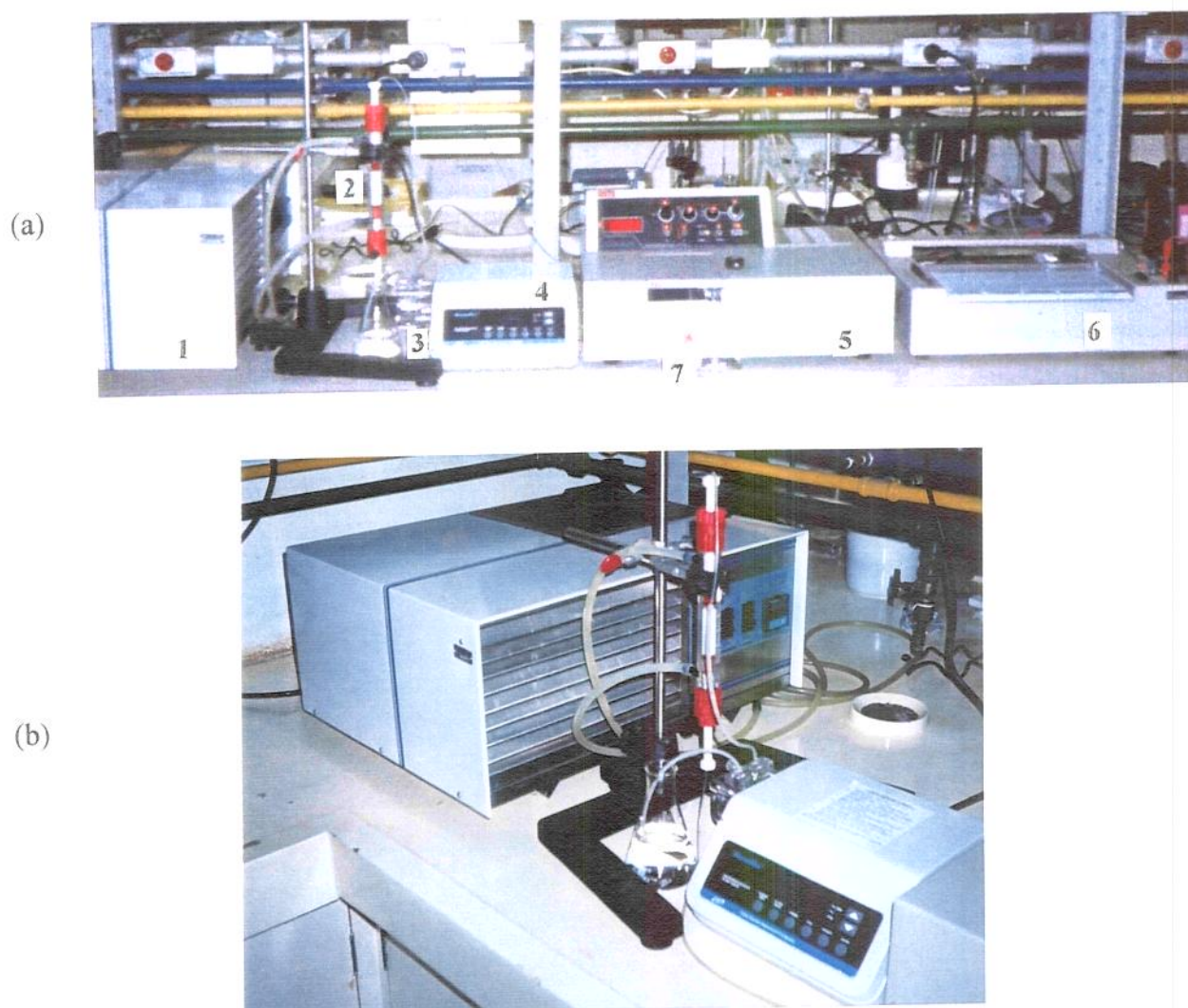


Figura 4.1: (a) Montagem experimental para separação de cefalosporina C em coluna de leito fixo. 1- Banho termostatizado. 2- Coluna cromatográfica. 3- Alimentação. 4- Bomba peristáltica. 5- Espectrofotômetro. 6- Registrador potenciométrico. 7- Frasco coletor. (b) Coluna cromatográfica utilizada. Pode-se observar a alimentação da solução de cefalosporina C e o leito de partículas de adsorvente.

As condições utilizadas para cada um dos experimentos estão indicadas na tabela 4.2.

Tabela 4.2: Condições geométricas e operacionais para os experimentos de separação de cefalosporina C em coluna de Amberlite XAD-2.

Experimento	L/ θ	d_p/θ	v (m/h)
1-2	5	0,0297	0,306
3-4	7,5	0,0297	0,306
5-6	10	0,0297	0,306
7-8	5	0,0210	0,306
9-10	5	0,0500	0,306
11-12	5	0,0297	0,153
13-14	5	0,0297	0,612

pH: 3,6

Temperatura: 25 °C

Na tabela 4.2, L é o comprimento da coluna, θ é o diâmetro da coluna, d_p é o diâmetro da partícula e v é a velocidade superficial.

Os experimentos foram realizados em duplicata, calculando-se a eficiência de utilização do leito (ϕ_1), eficiência de recuperação de cefalosporina C (ϕ_2), quantidades de cefalosporina C adsorvida no tempo de ruptura (Q_b) e no tempo de exaustão (Q_e) e produtividade (P).

O tempo de ruptura (t_b) e o tempo de exaustão (t_e) foram definidos como aqueles em que a concentração de saída atinge, respectivamente, 10 % e 90 % da concentração de alimentação.

A eficiência de utilização do leito da coluna (ϕ_1), a eficiência de recuperação da cefalosporina C (ϕ_2) e a produtividade (P) foram definidas como:

$$\phi_1 = \frac{Q_b}{Q_e} \quad (4.1)$$

$$\phi_2 = \frac{Q_b}{Q_b + Q_{\text{perd}}} \quad (4.2)$$

$$P = \frac{Q_e}{t_e} \quad (4.3)$$

onde:

$$Q_b = C_0 V_z t_b - V_z C_0 \int_{t=0}^{t=t_b} \frac{C}{C_0}(t) dt \quad (4.4)$$

$$Q_e = C_0 V_z t_e - V_z C_0 \int_{t=0}^{t=t_e} \frac{C}{C_0}(t) dt \quad (4.5)$$

$$Q_{\text{perd}} = V_z C_0 \int_{t=0}^{t=t_b} \frac{C}{C_0}(t) dt \quad (4.6)$$

V_z é a vazão de solução de cefalosporina C, Q_{ads} é a quantidade de cefalosporina C adsorvida na resina presente na coluna e Q_{perd} é a cefalosporina C perdida no efluente até t_b .

$\frac{C}{C_0}(t)$ corresponde à curva de ruptura, sendo a expressão obtida por ajuste polinomial da mesma (polinômio de 6^o grau).

4.1.3. Análise de Sensibilidade dos Parâmetros Geométricos e Operacionais da Coluna

A influência dos parâmetros geométricos e operacionais L/θ , d_p/θ e v sobre ϕ_1 , Q_b , Q_e e P foi avaliada pelo fator de sensibilidade (S).

S foi definido como:

$$S = \frac{\frac{\text{valor obtido na variavel de saida} - \text{valor de referencia da variavel de saida}}{\text{valor de referencia da variavel de saida}}}{\frac{\text{valor alterado da variavel de entrada} - \text{valor de referencia da variavel de entrada}}{\text{valor de referencia da variavel de entrada}}} \quad (4.7)$$

O fator de sensibilidade representa a porcentagem de alteração na variável de saída (ϕ , Q_b , Q_c e P) por unidade de porcentagem alterada na variável de entrada (L/θ , d_p/θ e v). Valores positivos representam ganho e valores negativos representam queda.

4.2. Ajuste dos Parâmetros do Modelo Matemático

Os parâmetros do modelo matemático foram ajustados por regressão não-linear, a partir de uma estimativa inicial, pela aplicação do método simplex geométrico flexível de NELDER & MEAD (1965), utilizado por BONOMI *et alii* (1993) e conhecido como método dos poliedros flexíveis ou simplex modificado.

Segundo MORGAN *et alii* (1990) o método simplex modificado consiste de uma técnica sequencial que usa a resposta imediatamente anterior para mover-se em direção à região da resposta de interesse, envolvendo dois novos conceitos, a expansão e a contração do simplex. O simplex é uma figura geométrica com $m+1$ vértices, sendo m o número de parâmetros a otimizar.

A flexibilidade do método permite uma determinação mais precisa do ponto ótimo, já que o simplex pode “encolher” nas suas proximidades. Além disso, o simplex modificado pode resultar em um número de ensaios menor que o simplex básico, porque o simplex pode “esticar-se” quando estiver longe do ponto procurado, aproximando-se mais rapidamente da região de interesse (BARROS *et alii*, 1995).

Esta técnica é especialmente efetiva quando o número de parâmetros a serem ajustados é elevado.

Os parâmetros do modelo matemático ajustados foram: as constantes Q_m , k_1 e k_2 , relacionadas à cinética de adsorção, o coeficiente de dispersão axial (E), a difusividade efetiva (D_{ef}), a difusividade molecular (D_m), a porosidade do leito (ϵ) e a porosidade da partícula (ϵ_p).

BONOMI *et alii* (1993) comentam que, a fim de resolver um complexo problema de otimização, é muito importante ter boas estimativas iniciais dos valores dos parâmetros do modelo. Estas estimativas iniciais são propostas na tabela 4.3.

Tabela 4.3: Estimativas iniciais para os parâmetros do modelo matemático.

Parâmetro	Símbolo	Estimativa Inicial	Fonte
Capacidade máxima da resina	Q_m	39,36 kg/m ³	*
Constante Cinética	k_1	3,66 (m ³ /kg)h ⁻¹	*
Constante Cinética	k_2	4,18 h ⁻¹	*
Porosidade do Leito	ε	0,37	BUCKEK & GELDART (1985)**
Porosidade da Partícula	ε_p	0,42	ROHM & HAAS (1989)***
Difusividade Efetiva	D_{ef}	7,78x10 ⁻⁷ m ² /h	*
Difusividade Molecular	D_m	1,7x10 ⁻⁶ m ² /h	SHERWOOD (1975)**
Coefficiente de Dispersão	E	5,45x10 ⁻⁴ m ² /h	GUNN (1987)**

* Valores obtidos em trabalho (em andamento) no Lab. de Bioengenharia, FEA/UNICAMP

** Valores estimados por correlações

*** Valor médio fornecido pelo fabricante

Para o ajuste dos parâmetros do modelo matemático pelo método simplex modificado desenvolveu-se, a partir do programa em linguagem FORTRAN proposto por HIMMELBLAU (1972), uma versão em linguagem PASCAL (Turbo Pascal 7.0, Borland) adaptada ao caso em estudo, sendo que o algoritmo consistiu essencialmente de um conjunto de regras para o deslocamento do simplex.

O programa para simulação da separação de cefalosporina C coluna cromatográfica foi acoplado ao programa SIMPLEX como uma sub-rotina do mesmo.

Definiu-se a função objetivo a ser minimizada como sendo a soma dos quadrados dos erros:

$$FO = \sum_{i=1}^N (C / C_{0sim} - C / C_{0exp})^2 \quad (4.8)$$

Na equação (4.7), N corresponde ao número de pontos considerados, e C/C_{0sim} e C/C_{0exp} representam, respectivamente, os valores simulados e experimentais de C/C_0 na saída da coluna.

O ajuste termina quando o valor de FO nos vértices do simplex, FO_i , e a média destes valores, $\bar{FO}$, satisfaz a inequação.

$$\left(\frac{\sum_{i=1}^m (FO_i - \bar{FO})^2}{m+1} \right)^{1/2} < \omega \quad (4.9)$$

Na equação (4.9), ω é o parâmetro de convergência ($\omega = 10^{-10}$, de acordo com CASSILAS *et alii*, 1993).

5. RESULTADOS

5.1. Ensaios Experimentais de Separação de Cefalosporina C em Coluna de Leito Fixo

A tabela 5.1 mostra um resumo dos resultados obtidos para os ensaios experimentais propostos no item 4.1.2.

Tabela 5.1: Resultados obtidos nos experimentos de separação de cefalosporina C em coluna de leito fixo.

Ensaio	L/θ	d_p/θ	v (m/h)	t_b (h)	t_c (h)	$Q_b \times 10^6$ (Kg)	$Q_c \times 10^6$ (Kg)	ϕ_1	ϕ_2	$P \times 10^7$ (Kg/h)
1	5	0,0297	0,306	0,80	3,24	1,13	2,56	0,44	0,98	7,90
2	5	0,0297	0,306	0,77	2,95	1,08	2,43	0,44	0,98	8,24
3	7,5	0,0297	0,306	1,15	3,90	1,61	3,32	0,49	0,97	8,52
4	7,5	0,0297	0,306	1,18	3,81	1,66	3,32	0,50	0,98	8,71
5	10	0,0297	0,306	1,59	4,58	2,24	4,17	0,54	0,98	9,10
6	10	0,0297	0,306	1,68	4,68	2,36	4,32	0,55	0,98	9,22
7	5	0,0210	0,306	0,95	2,43	1,35	2,29	0,59	0,98	9,42
8	5	0,0210	0,306	0,94	2,32	1,34	2,23	0,60	0,99	9,62
9	5	0,0500	0,306	0,50	3,44	0,70	2,34	0,30	0,97	6,81
10	5	0,0500	0,306	0,50	3,32	0,70	2,27	0,31	0,97	6,83
11	5	0,0297	0,153	1,90	5,50	1,33	2,48	0,54	0,97	4,51
12	5	0,0297	0,153	1,93	5,44	1,36	2,49	0,55	0,98	4,57
13	5	0,0297	0,612	0,31	1,89	0,87	2,65	0,33	0,97	14,01
14	5	0,0297	0,612	0,27	2,04	0,75	2,71	0,28	0,97	13,27

Com respeito à relação comprimento do leito - diâmetro da coluna (L/θ), um aumento desta foi favorável, como mostrado na figura 5.1, já que a fração não utilizada da coluna, quando a ruptura ocorre, decresceu e a eficiência de utilização do leito aumentou. As

quantidades adsorvidas, até o tempo de ruptura e exaustão, tiveram um aumento pronunciado, já que tem-se maior quantidade de adsorvente e, ao contrário do esperado, a produtividade aumentou. Portanto, prefere-se a utilização de maiores valores de L/θ , mas deve-se considerar o tempo de ruptura (t_b) resultante, verificando se não há perdas de cefalosporina C por decomposição desta. A perda de carga também deve ser considerada.

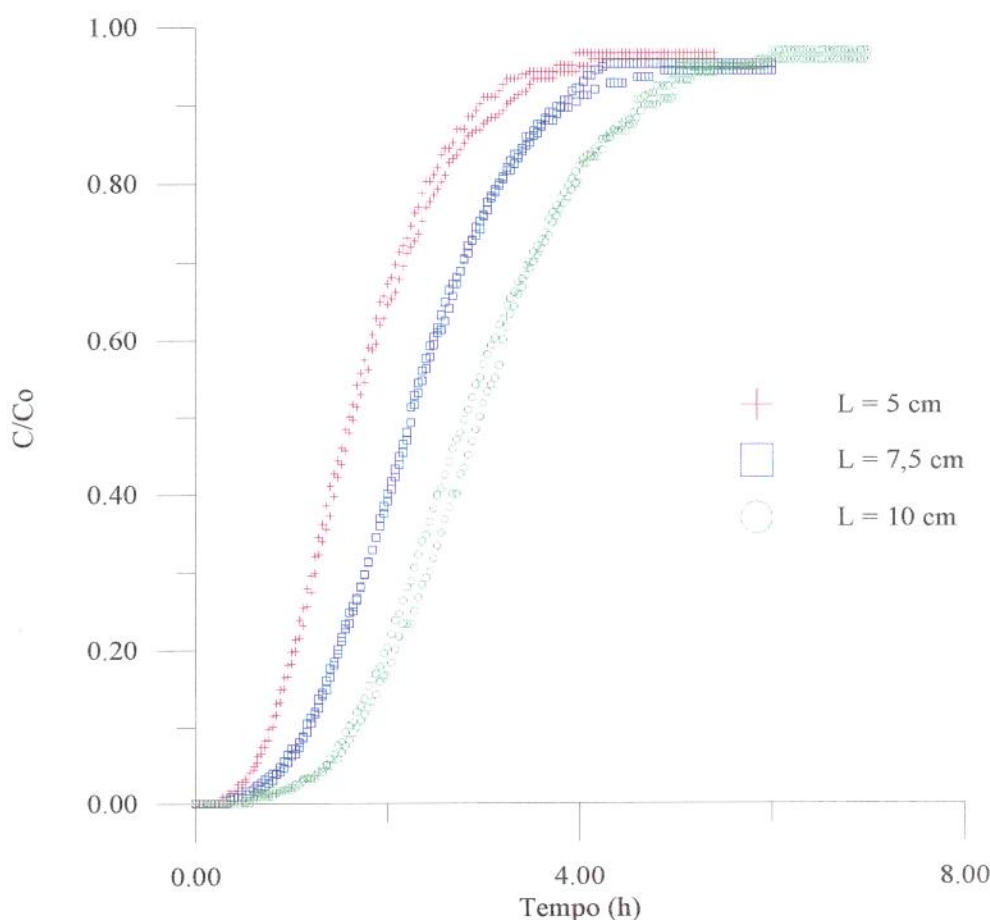


Figura 5.1: Influência de L/θ na curva de ruptura obtida na separação de cefalosporina C em coluna de leito fixo. $C_0 = 0,06$ g/l; $d_p/\theta = 0,0297$; $v = 0,306$ m/h.

A figura 5.2 mostra o efeito da relação diâmetro da partícula - diâmetro da coluna (d_p/θ) na separação da cefalosporina C. Para partículas menores ($d_p < 210$ μ m) observou-se um maior tempo de ruptura, e a elevação da concentração de cefalosporina C na saída da coluna foi mais abrupta, o que evidencia uma maior taxa de adsorção, bem como maior produtividade. À medida que d_p foi aumentado, observou-se redução no tempo de ruptura e na produtividade. As quantidades de cefalosporina C adsorvida nos tempos de ruptura e de

exaustão e a eficiência de utilização do leito foram fortemente influenciados por d_p/θ , verificando-se aumento de Q_b , e ϕ_1 com a redução de d_p , pois a capacidade de adsorção está relacionada à superfície específica. A adsorção da cefalosporina C em Amberlite XAD-2 ocorre principalmente na superfície e camadas mais externas da resina, sendo que partículas menores resultam em maior superfície disponível.

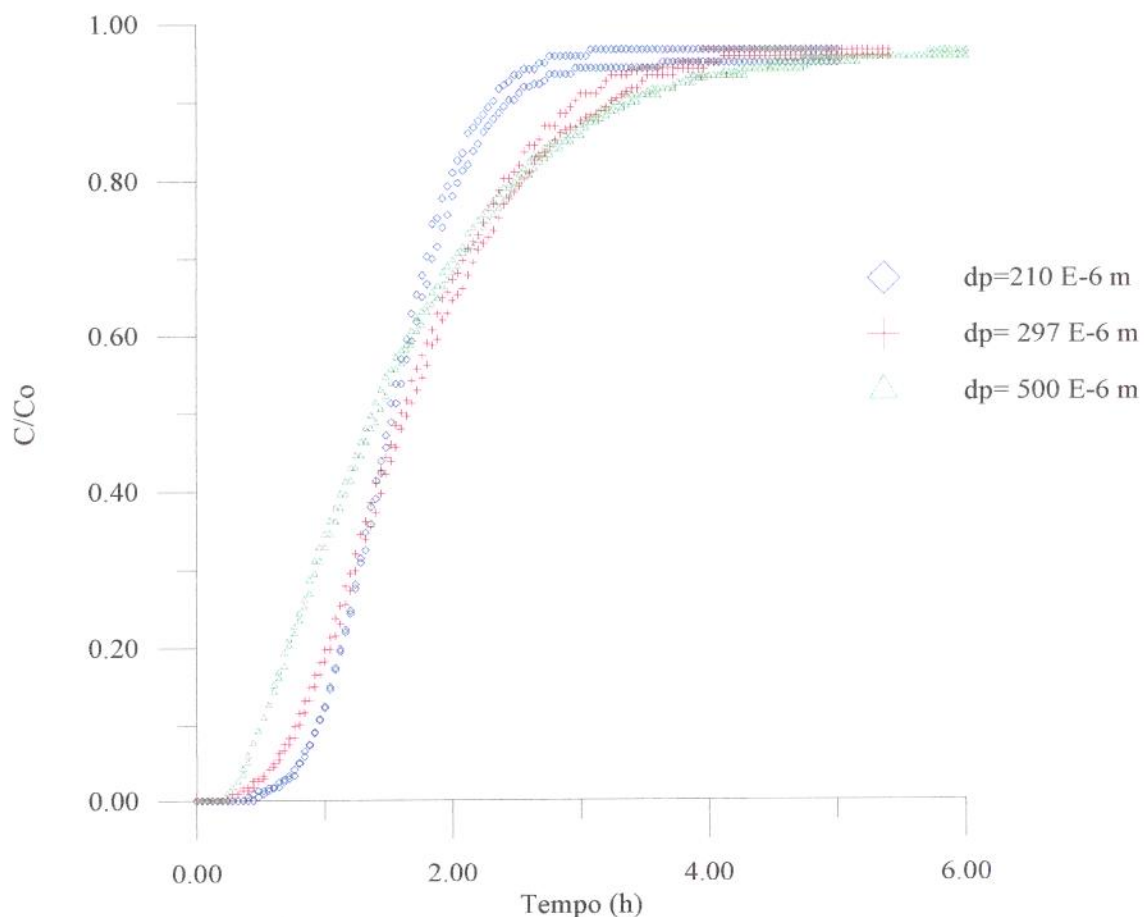


Figura 5.2: Influência de d_p/θ na curva de ruptura obtida na separação de cefalosporina C em coluna de leito fixo. $C_0 = 0,06$ g/l; $L/\theta = 5$; $v = 0,306$ m/h.

Além disso, pela correlação de ARNOLD *et alii* (1985), apresentada na equação (3.19), à medida que d_p é aumentado o coeficiente de transferência de massa diminui, dificultando a adsorção.

A figura 5.3 mostra a influência da velocidade superficial (v) na adsorção da cefalosporina C em coluna de leito fixo contendo Amberlite XAD-2. Apesar de um aumento

na velocidade superficial reduzir a resistência à transferência de massa, conforme a correlação de ARNOLD *et alii* (1985), esse aumento, na faixa estudada, mostrou-se desfavorável, pelo fato da taxa de adsorção ser lenta, havendo arraste da cefalosporina C através da coluna, que foi evidenciado pelo aumento brusco da concentração de cefalosporina C na saída, já no início do ensaio, e pelo menor tempo de ruptura.

Observa-se, portanto, que há uma limitação na velocidade superficial, em decorrência da cinética de adsorção.

Notou-se entretanto que um aumento em v levou a um ganho em produtividade, portanto na escolha de uma velocidade superficial para o processo deve-se considerar o binômio eficiência e produtividade, tendo em vista aspectos econômicos.

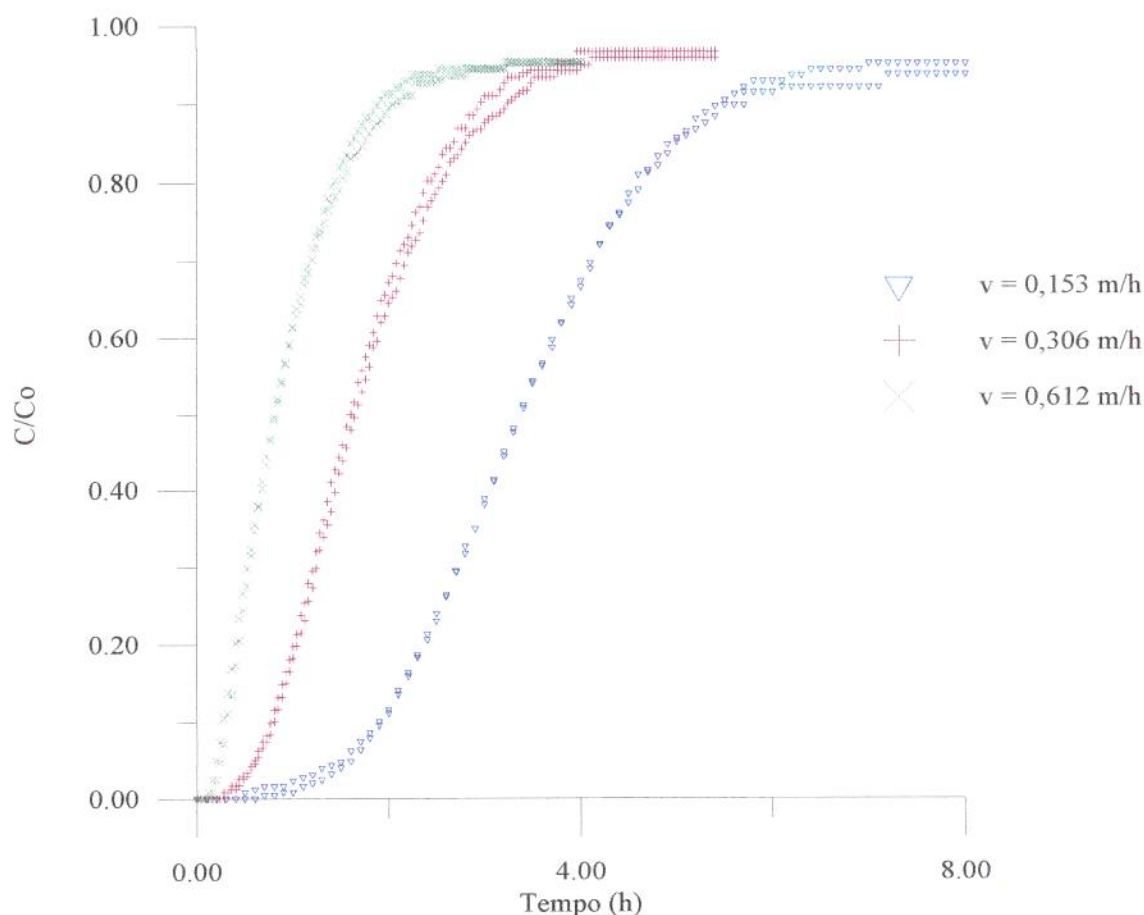


Figura 5.3: Influência da velocidade superficial na curva de ruptura obtida na separação de cefalosporina C em coluna de leito fixo. $C_0 = 0,06$ g/l; $L/\theta = 5$; $dp/\theta = 0,0297$.

Em todos os ensaios realizados, a eficiência de recuperação da cefalosporina C (ϕ_2) foi alta, indicando pequenas perdas de cefalosporina C até a ruptura.

É interessante também observar que a saturação em todas as curvas não é completa, pois C/C_0 é menor que 1 na saída da coluna. Este fato pode ser explicado por problemas difusionais que limitam o processo de adsorção.

Um outro aspecto que deve ser notado é que a quantidade de cefalosporina C adsorvida tanto em t_b como em t_e é baixa, quando comparada com a capacidade máxima da resina. Este baixo desempenho é característico do processo de separação de cefalosporina C por adsorventes poliméricos não-polares, sendo o fato comentado por VOSER (1982), ou seja, a capacidade dinâmica da coluna é baixa.

As tabelas 5.2 e 5.3 mostram os resultados obtidos por FIROUZTALE *et alii* (1994) no estudo da influência de L , d_p e v sobre a eficiência de uma coluna de leito fixo através de simulações.

Tabela 5.2: Dados obtidos por FIROUZTALE *et alii* (1994) em simulações de separação de cefalosporina C em coluna de leito fixo contendo a resina Amberlite XAD-16.

L (m)	d_p (μ m)	v (m/h)	Eficiência
0,125	84	5,73	0,89
0,125	116	5,73	0,80
0,125	200	5,73	0,51
0,125	310	5,73	0,24
0,125	486	5,73	0,08
0,250	310	5,73	0,46
0,500	310	5,73	0,70
0,750	310	5,73	0,80

$$C_0 = 10 \text{ mg/ml; } \theta = 0,02 \text{ m;}$$

Tabela 5.3: Dados obtidos por FIROUZTALE *et alii* (1994) em simulações de separação de cefalosporina C em coluna de leito fixo contendo a resina Amberchrom CG-161M.

L (m)	d _p (µm)	v (m/h)	Eficiência
0,062	84	1,91	0,91
0,062	84	3,82	0,84
0,062	84	7,64	0,73
0,062	84	15,28	0,53
0,062	84	22,92	0,41

C₀ = 10 mg/ml; θ = 0,02 m;

No trabalho de FIROUZTALE *et alii* (1994) a eficiência foi definida como a relação entre a quantidade de cefalosporina C adsorvida quando $C/C_0 = 0,01$ e a capacidade dinâmica da coluna.

A comparação torna-se difícil, pois as condições utilizadas pelos autores foram bem distintas (C₀, L, θ, v) e as resinas estudadas apresentam propriedades físicas diferentes da resina Amberlite XAD-2. Pode-se observar, no entanto, que os valores obtidos neste trabalho para a eficiência de utilização do leito são compatíveis com os apresentados por FIROUZTALE *et alii* (1994) e os comportamentos observados, ou seja, como L/θ, d_p/θ e v afetam φ_I, foram os mesmos.

5.2. Fator de Sensibilidade dos Parâmetros Geométricos e Operacionais e Geométricos da Coluna

O estudo do fator de sensibilidade dos parâmetros geométricos e operacionais da coluna é mostrado na tabela 5.4, observando-se um ganho na eficiência de utilização do leito (φ_I) com o aumento de L/θ e uma substancial redução na eficiência com o aumento de d_p/θ e v, nas faixas consideradas no estudo.

Tabela 5.4: .Fator de sensibilidade dos parâmetros geométricos e operacionais da coluna.

Parâmetro	Fator de Alteração	$S_{\phi I}^*$	$S_{Q_b}^*$	$S_{Q_e}^*$	S_p^*
L/θ	2,00	+ 0,227	+ 1,027	+0,671	+0,127
d_p/θ	2,38	- 0,307	- 0,348	+0,014	-0,205
v (m/h)	4,00	- 0,147	-0,133	-0,030	+0,668

* O índice corresponde à variável de saída

Quanto à quantidade de cefalosporina C adsorvida no tempo de ruptura (Q_b), é muito incrementada com o aumento de L/θ e reduzida, em menor grau, com o aumento de d_p/θ e v . A quantidade adsorvida no tempo de exaustão (Q_e) é favorecida pelo aumento de L/θ , mas não é fortemente influenciada por d_p/θ e v .

A produtividade é fortemente influenciada por v e, em menor proporção, por L/θ (ganho) e d_p/θ (perda).

Estes resultados mostram que é fundamental a otimização das condições geométricas e operacionais da coluna, a fim de maximizar a eficiência e produtividade, o que pode ser feito através de simulações com um modelo validado.

5.3. Ajuste dos Parâmetros do Modelo Matemático

No ajuste dos parâmetros do modelo matemático pelo método simplex modificado, adotou-se o tempo de ruptura como limite máximo para coleta dos dados simulados. Os dados experimentais utilizados corresponderam aos valores médios de C/C_0 nos ensaios 1 e 2 ($L/\theta = 5$, $d_p/\theta = 0,0297$ e $v = 0,306$ m/h), a cada 0,04 h até o tempo de ruptura, totalizando 21 pontos.

Os dados obtidos no ajuste dos parâmetros do modelo matemático pelo método simplex modificado após 240 horas de processamento (microcomputador Pentium 100) estão indicados na tabela 5.5.

Convém salientar que estes dados são parciais, pois o processamento ainda não havia atingido seu final, determinado pelo valor de ω estabelecido. Certamente, melhor ajuste ter-se-ia conseguido com o andamento do programa.

Tabela 5.5: Valores estimados e ajustados dos parâmetros do modelo matemático pelo método simplex modificado.

Parâmetro	Símbolo	Estimativa Inicial	Valor Ajustado
Capacidade máxima da resina	Q_m	39,36 kg/m ³	43,87 kg/m ³
Constante Cinética	k_1	3,66 (m ³ /kg)h ⁻¹	4,08 (m ³ /kg)h ⁻¹
Constante Cinética	k_2	4,18 h ⁻¹	4,66 h ⁻¹
Porosidade do Leito	ε	0,40	0,70
Porosidade da Partícula	ε_p	0,42	0,47
Difusividade Efetiva	D_{ef}	7,78x10 ⁻⁷ m ² /h	1,05x10 ⁻¹⁰ m ² /h
Difusividade Molecular	D_m	1,7x10 ⁻⁶ m ² /h	1,89x10 ⁻⁶ m ² /h
Coefficiente de Dispersão	E	5,45x10 ⁻⁴ m ² /h	6,07x10 ⁻⁴ m ² /h

Observa-se que os parâmetros com maior alteração em relação à estimativa inicial são a difusividade efetiva e a porosidade do leito.

SOMMERS *et alii* (1994) usaram a difusividade efetiva como parâmetro de ajuste do modelo de adsorção de endo-poligalacturonase sobre alginato.

Há evidências que o processo de adsorção de cefalosporina C em Amberlite XAD-2 é governado pelo mecanismo de difusão nos poros (FIROUZTALE *et alii*, 1994).

Na adsorção de lisozima em material poroso, WEAVER & CARTA (1996) adotaram o número de Biot (**Bi**) como forma de avaliar a importância relativa da difusão intraparticular em relação à resistência à transferência de massa externa Encontraram valores de 7,0 a 54,0 ,

dependendo da concentração de lisozima, tendo considerado predomínio da difusão intraparticular no processo de adsorção.

Bi é definido como:

$$Bi = \frac{K_s R}{D_{ef}} \tag{5.1}$$

Quanto maior for **Bi**, maior a importância relativa da difusão intraparticular no processo de adsorção, pois menor é o valor da difusividade efetiva, comparado ao coeficiente global de transferência de massa.

Utilizando-se os valores estimados para difusividade efetiva e coeficiente global de transferência de massa tem-se, para os ensaios experimentais realizados, os valores de **Bi** apresentados na tabela 5.6.

Tabela 5.6: Valores estimados para o coeficiente de transferência de massa, difusividade efetiva e número de Biot nos experimentos realizados.

Ensaio	K_s (m/h)	D_{ef} (m ² /h)	Bi
1 a 6	0,029	$7,78 \times 10^{-6}$	5,54
7 - 8	0,037	$7,78 \times 10^{-6}$	4,99
9 - 10	0,020	$7,78 \times 10^{-6}$	6,43
11 - 12	0,024	$7,78 \times 10^{-6}$	4,58
13 - 14	0,036	$7,78 \times 10^{-6}$	6,87

Observa-se, na tabela 5.6, valores de **Bi** próximos aos obtidos por WEAVER & CARTA (1996) para a lisozima (7,0 para uma concentração de lisozima de 0,1 g/l), o que mostra a importância da difusão intraparticular no processo em estudo.

Pelo método simplex modificado, a difusividade efetiva foi ajustada a um valor muito diferente do esperado para a difusão da cefalosporina C dentro dos poros de uma resina polimérica.

CASSILAS *et alii* (1993), ajustando a difusividade efetiva através de um modelo de adsorção em tanque agitado, encontraram o valor de $1,44 \times 10^{-6} \text{ m}^2/\text{h}$.

KIRKBY *et alii* (1986) e FIROUZTALE *et alii* (1994), também por ajuste a um modelo matemático, encontraram o valor de $7,2 \times 10^{-7} \text{ m}^2/\text{h}$.

Todavia, JUANG & LIN (1995), no estudo da adsorção de metais em Amberlite XAD-2 impregnada com di (2 - etilhexil) ácido fosfórico (D2EHPA), observaram que a adsorção de Zn^{2+} era mais lenta e difícil que Cu^{2+} , evidenciado pelas difusividades efetivas, respectivamente $4,79-9,54 \times 10^{-10} \text{ m}^2/\text{h}$ e $4,10-9,32 \times 10^{-9} \text{ m}^2/\text{h}$. Os autores comentam que a razão para este resultado não é clara, mas poderia estar relacionada à estrutura do complexo metal-D2EHPA e ao tamanho dos poros da partícula.

O valor de difusividade efetiva ajustado é da mesma ordem de grandeza que o valor obtido por JUANG & LIN (1995) para o Zn^{2+} , sendo que a cefalosporina C utilizada foi na forma de sal de zinco.

Outro aspecto é o fato de que a carga do grupo Zn^{2+} poderia resultar em forças de repulsão entre este grupamento e a superfície não-polar do adsorvente, o que dificultaria tanto a adsorção superficial como a difusão intraparticular, o que seria consistente com o fato da resina apresentar baixa capacidade dinâmica.

Estes fatos comentados indicam que é necessária a determinação experimental da difusividade efetiva da cefalosporina C e da porosidade do leito, a fim de que estimativas iniciais mais confiáveis possam ser utilizadas para proceder-se ao ajuste dos parâmetros do modelo matemático.

Os resultados experimentais e resultados preditos por simulação com os parâmetros ajustados do modelo matemático, conforme indicado na tabela 5.5, até o tempo de ruptura, correspondente à faixa de operação da coluna, são mostrados na figura 5.4.

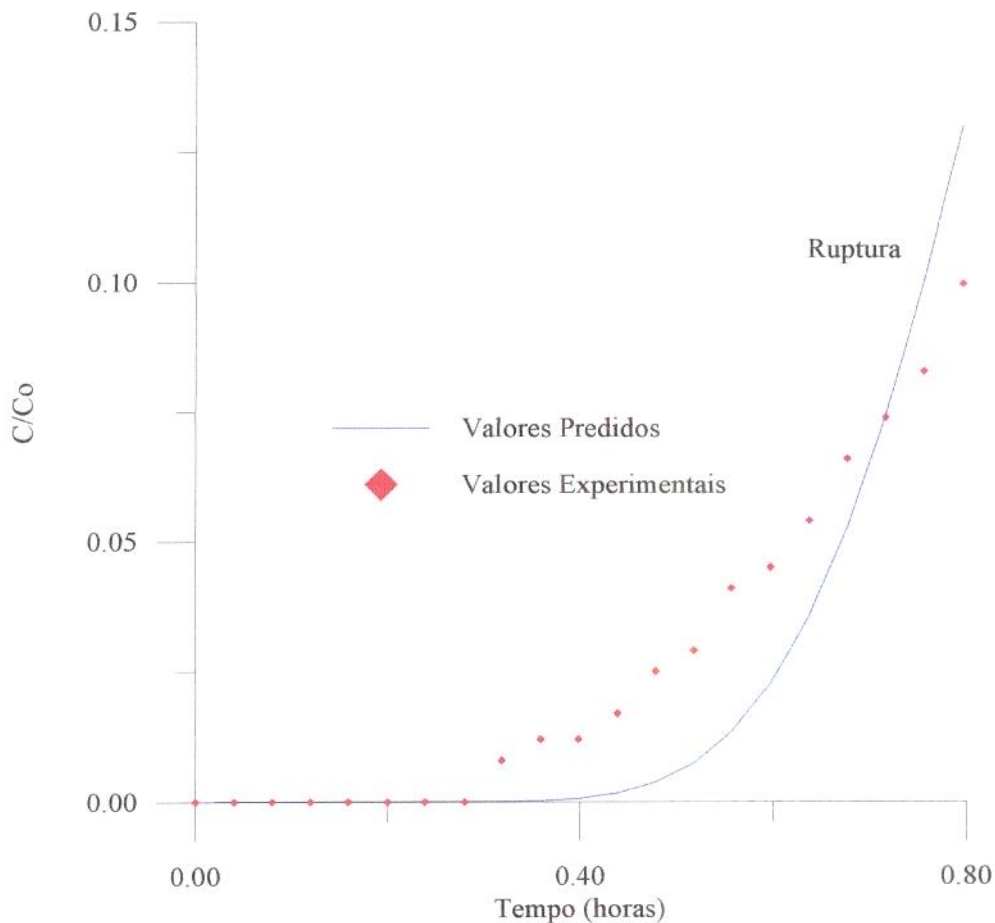


Figura 5.4: Valores experimentais e preditos pelo modelo matemático até o tempo de ruptura. $C_0 = 0,06$ g/l; $L/\theta = 5$; $dp/\theta = 0,0297$; $v = 0,306$ m/h.

O coeficiente de correlação encontrado, entre os dados experimentais e simulados, foi de 0,874. Entretanto, os tempos de ruptura experimental e simulado encontrados, respectivamente 0,78 h e 0,76 h, foram bem próximos. Além disso, apesar do coeficiente de correlação baixo, indicando um ajuste não satisfatório, houve sensível melhoria em relação aos testes iniciais (simulações) realizados com os parâmetros não ajustados (estimativas iniciais).

Convém ressaltar que as curvas de ruptura simuladas apresentadas no trabalho de

Os dados experimentais e simulados até o final do experimento são mostrados na figura 5.5. Verificou-se que o ajuste obtido ainda não foi satisfatório, portanto mais simulações em computador devem ser realizadas, visando um melhor ajuste dos parâmetros pelo método simplex modificado.

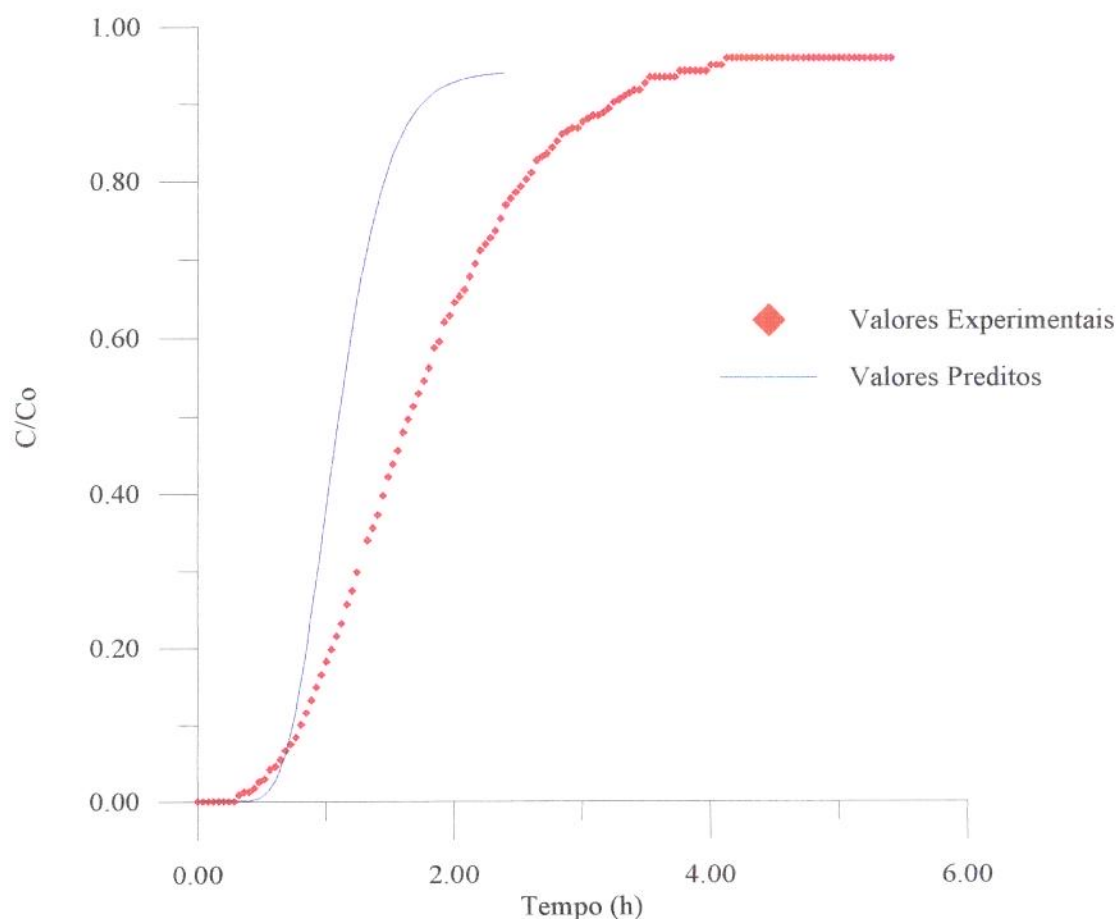


Figura 5.5: Valores experimentais e preditos com o ajuste do modelo matemático. $C_0 = 0,06$ g/l; $L/\theta = 5$; $dp/\theta = 0,0297$; $v = 0,306$ m/h.

6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste trabalho permitem as seguintes conclusões:

- ◆ Os comportamentos verificados nas curvas de ruptura frente a variações em L/θ , d_p/θ e v são coerentes com a teoria de adsorção em coluna de leito fixo, e a reprodutibilidade dos experimentos foi boa, portanto a metodologia experimental proposta mostrou-se apropriada.
- ◆ O estudo do fator de sensibilidade mostrou que os parâmetros operacionais e geométricos da coluna, passíveis de manipulação, influenciam substancialmente a eficiência de utilização do leito da coluna, sendo que o aumento de L/θ e a redução de d_p/θ e v melhoram a eficiência do processo. Quanto à produtividade, esta é aumentada incrementando-se os valores de L/θ e v e reduzindo d_p/θ . A quantidade de cefalosporina C adsorvida no tempo de ruptura é muito incrementada com o aumento de L/θ e reduzida, em menor proporção, por d_p/θ e v . Os resultados obtidos justificam uma investigação ampla visando a otimização destas condições, especialmente v , para a maximização da eficiência e produtividade.
- ◆ A resistência à difusão intraparticular é a etapa limitante do processo, podendo considerar a resistência à transferência de massa externa negligenciável.
- ◆ As estimativas iniciais adotadas para as constantes cinéticas Q_m , k_1 e k_2 , utilizadas no ajuste dos parâmetros do modelo matemático pelo método simplex modificado, podem ser consideradas satisfatórias, pois, no ajuste, não sofreram grande alteração.
- ◆ A difusividade efetiva (D_{ef}) e a porosidade do leito (ϵ_p) foram os parâmetros do modelo matemático mais alterados, em relação a estimativa inicial, sendo que afetam muito a curva de ruptura. É, portanto, necessário uma investigação mais profunda a respeito destes parâmetros.

7. SUGESTÕES E RECOMENDAÇÕES

- ♦ O programa SIMPLEX pode ser aperfeiçoado com o estabelecimento de limites inferior e superior para os parâmetros a serem ajustados.
- ♦ A difusividade efetiva, a porosidade do leito e a porosidade da partícula podem ser determinados experimentalmente, permitindo, no ajuste, limitar sua variação a uma faixa próxima aos valores experimentais.
- ♦ Com os dados experimentais disponíveis, para diferentes condições geométricas e operacionais da coluna, pode-se partir para novos ajustes dos parâmetros do modelo matemático pelo método simplex modificado, utilizando todo o intervalo de tempo de realização do experimento.
- ♦ Com o modelo matemático validado é possível a otimização dos parâmetros geométricos e operacionais da coluna, avaliando-as em uma ampla faixa, procurando maximizar a eficiência de utilização do leito e a produtividade.
- ♦ É interessante explorar aspectos referentes à dessorção da cefalosporina C, experimentalmente e por modelagem matemática e simulação.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ANDRISANO, R.; GUERRA, G.; MASCELLANI, G. Extraction of cephalosporin C from fermentation broths via lipophilic intermediates and the production of 7-aminocephalosporanic acid (7-ACA). **Journal of Applied Chemistry and Biotechnology**, Oxford, v. 26, n. 8, p. 459 - 468, aug., 1976.
2. ARNOLD, F. H.; BLANCH, H. W.; WILKE, C. R. **The Chemical Engineering Journal**, Lausanne, v. 30, B25, 1985.
3. ATKINS, P. W. **Physical chemistry**. 3. ed. New York: W. H. Freeman and Company, 1986. 857 p.
4. BAILEY, J. E.; OLLIS, D. F. **Biochemical engineering fundamentals**. 2 ed. Singapore: McGraw-Hill Book Company, 1986. 984 p.
5. BARROS, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Planejamento e otimização de experimentos**. Campinas: Editora da UNICAMP, 1995. 299 p.
6. BELTER, P. A.; CUSSLER, E. L.; HU, W. **Bioseparations: downstream processing for biotechnology**. New York: John Wiley & Sons, 1988. 368 p.
7. BONOMI, A.; AUGUSTO, E. F. P.; BARBOSA, N. S.; MATTOS, M. N.; MAGOSSÍ, L. R.; SANTOS, A. L. Unstructured model proposal for the microbial oxidation of D-sorbitol to L-sorbose. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 31, n. 1, p. 39 - 59, oct., 1993.

8. BROCKLEBANK, M. P. Downstream processing plant and equipment. In: ASENJO, J. A. **Separation processes in biotechnology**. New York: Marcel Dekker, 1990. p. 617 - 740.
9. BUCZEK, B.; GELDART, D. Determination of the density of porous particles using very fine dense powders. **Powder Technology**, Lausanne, v. 45, n. 2, p. 173 - 176, jan., 1986.
10. CASSILAS, J. L.; MARTINEZ, M.; ADDO-YOBO, F.; ARACIL, J. Modelling of the adsorption of cephalosporin C on modified resins in a stirred tank. **The Chemical Engineering Journal**, Lausanne, v. 52, n. 3, p. B71 - B75, 1993.
11. CHAPRA, S. C.; CANALE, R.P. **Numerical methods for engineers**. 2 ed. Singapore: McGraw-Hill Book Co., 1990. 812 p.
12. CHASE, H. A. Affinity separations utilising immobilised monoclonal antibodies - a new tool for the biochemical engineer. **Chemical Engineering Science**, Oxford, v. 39, n. 7/8, p. 1099 - 1125, 1984.
13. CHAUBAL, M. V.; PAYNE, G. F.; REYNOLDS, C. H.; ALBRIGHT, R. L. Equilibria for the adsorption of antibiotics onto neutral polymeric sorbents: experimental and modeling studies. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v. 47, n. 2, p. 215 - 226, july 20, 1995.
14. COLLINS, C. H. Princípios básicos de cromatografia. In: COLLINS, C. H.; BRAGA, G.L.; BONATO, P. S. **Introdução a métodos cromatográficos**. 6 ed. Campinas: Editora da UNICAMP, 1995. p. 11 - 27.
15. CRUEGER, W.; CRUEGER, A. **Biotecnologia: manual de microbiologia industrial**. Zaragoza: Editorial Acirbia, 1993. 413 p.

16. DECHOW, F.J. **Separation and purification techniques in biotechnology**. Park Ridge: Noyes Publications, 1989. 490 p.
17. FIROUZTALE, E.; SCOTT, A. P.; DALVIE, S. K.; BLOHN, G. M. Experimental and theoretical study of key parameters of adsorption on reverse phase macroporous resins. **AIChE Symposium Series**, New York, v. 88, n. 290, p. 25 - 33, sept., 1992.
18. FIROUZTALE, E.; MAIKNER, J. J.; DEISSLER, K. C.; CARTIER, P. G. Validation of a theoretical model for adsorption using cephalosporin C and polymeric reversed-phase resins. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 658, n. 2, p. 361 - 370, jan. 14, 1994.
19. FOUST, A.S.; WENZEL, L. A.; CLUMP, C. W.; MAUS, L.; ANDERSEN, L. B. **Princípios das operações unitárias**. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Dois, 1982. 670 p.
20. FREITAG, R.; HORVÁTH, C. Chromatography in the downstream processing of biotechnological products. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, Berlin, v. 53, p.17 - 59, 1995.
21. GALE, F.R.S.; CUNDLIFFE, E.; REYNOLDS, P.E.; RICHMOND, M. H.; WARING, M. J. **The molecular basis of antibiotic action**. London: John Wiley & Sons, 1972. 456 p.
22. GHOSH, A. C.; BORA, M. M.; DUTTA, N. N. Developments in liquid membrane separation of beta-lactam antibiotics. **Bioseparation**, Dordrecht, v. 6, n. 2, p. 91 - 105, apr., 1996.

23. GHOSH, A.C.; MATHUR, R.K.; DUTTA, N.N. Extraction and purification of cephalosporin antibiotics. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, Berlin, v. 56, p. 111 - 145, 1997.
24. GJERDE, D. T.; FRITZ, J.S. **Ion chromatography**. 2.ed. New York: Hüthig, 1987. 283 p.
25. 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**, London, v. 67, n. 3, p. 232 - 242, may, 1989.
26. GUNN, D.J. Axial and radial dispersion in fixed beds. **Chemical Engineering Science**, Oxford, v. 42, n. 2, p. 363 - 373, 1987.
27. HANO, T.; MATSUMOTO, M.; OHTAKE, T.; HORI, F. Reactive extraction of cephalosporin C. **Journal of Chemical Engineering of Japan**, Tokyo, v. 25, n. 3, p. 293 - 297, june, 1992.
28. HICKETIER, M.; BUCHHOLZ, K. Investigations on cephalosporin C adsorption kinetics and equilibria. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 32, n. 6, p. 680 - 685, mar., 1990.
29. HIMMELBLAU, D. M. **Applied nonlinear programming**. New York: McGraw-Hill, 1972.

30. JUANG, R. S.; LIN, H. C. Metal sorption with extractant - impregnated macroporous resins. 2. Chemical reaction and particle diffusion kinetics. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, Sussex, v. 62, n. 2, p. 141 - 147, feb., 1995.
31. KASTNER, G. S.; GÖLKER, C. Product recovery in biotechnology. In: PRÄVE, P.; FAUST, U.; WOLFGANG, S.; SUKATSCH, D. A. **Basic biotechnology: a student's guide**. Weinheim: VCH Verlagsgesellschaft, 1989. p. 279 - 321.
32. KIRKBY, N. F.; SLATER, N. K. H.; WEISENBERGER, K. H.; ADDO-YOBO, F.; DOULIA, D. An HPLC technique for parameter estimation for reversed-phase chromatography: a case study on cephalosporin C. **Chemical Engineering Science**, Oxford, v. 41, n. 8, p. 2005 - 2016, 1986.
33. KRSTULOVIC, A. M.; BROWN, P. R. **Reversed-phase high-performance liquid chromatography: theory, practice and biomedical applications**. New York: John Wiley & Sons, Inc, 1982. 296 p.
34. LI, Q.; GRANDMAISON, E. W.; HSU, C. C.; TAYLOR, D.; GOOSEN, M. F. A. Interparticle and intraparticle mass transfer in chromatographic separation. **Bioseparation**, Dordrecht, v. 5, n. 4, p. 189 - 202, aug., 1995.
35. MOORE, W. J. **Físico química**. São Paulo: Edgard Blücher, 1976. v. 2. 866 p.
36. MORGAN, E.; BURTON, K. W. Optimization using the modified simplex method. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, Amsterdam, v. 7, n. 3, p. 209 - 222, feb., 1990.

37. NELDER, J. A.; MEAD, R. A simplex method for function minimization. **The Computer Journal**, London, v. 7, n. 4, p. 308 - 313, jan., 1965.
38. NEWTON, G. G. F.; ABRAHAM, E. P. Isolation of cephalosporin C, a penicillin-like antibiotic containing D- α -aminoadipic acid. **Bioch.**, v. 62, p. 651 - 658, 1956.
39. PERRIN, D. D. Buffers of low ionic strength for spectrophotometric pK determinations. **Australian Journal of Chemistry**, Melbourne, v. 16, p. 572 - 578, 1963.
40. ROHM & HAAS COMPANY. **Separation technologies**. Philadelphia: 1989.
41. SALTO, F.; PRIETO, J. G. Interactions of cephalosporins and penicillins with nonpolar macroporous styrenedivinylbenzene copolymers. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, Washington, v. 70, n. 9, p. 994 - 998, sept., 1981.
42. SHEN, Y. Q.; WOLFE, S.; DEMAINE, A. L. Levels of isopenicillin n synthetase and deacetoxycephalosporin C synthetase in *Cephalosporium acremonium* producing high and low levels of cephalosporin C. **Bio/technology**, New York, v. 4, n. 1, p. 61 - 64, jan., 1986.
43. SHERWOOD, T. K.; PIGFORD, R. L.; WILKE, C. R. **Mass transfer**. Tokyo: McGraw-Hill, 1975. 677 p.
44. SMITH, A. Cephalosporins. In: MOO-YOUNG, M. **Comprehensive biotechnology**. Oxford: Pergamon Press, 1985. v. 3, p. 163 - 186.

45. SRIDHAR, P.; SASTRI, N.V.S.; MODAK, J.M.; MUKHERJEE, A. K. Mathematical simulation of bioseparation in an affinity packed column. **Chemical and Engineering Technology**, Weinheim, v.17, n. 6, p. 422 - 429, dec., 1994.
46. SOMMERS, W. A. C.; SMOLDERS, A. J. J.; BEVERLOO, W. A.; ROZIE, H. J.; VISSER, J.; ROMBOUTS, F. M.; van't RIET, K. Modelling the adsorption of endo - polygalacturonase on alginate beads. **Bioseparation**, Dordrecht, v. 4, p. 285 - 298, 1994.
47. VOSER, W. Isolation of hydrophilic fermentation products by adsorption chromatography. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 32, n. 1, p. 109 - 118, jan., 1982.
48. VOSER, W.; WEISS, K. Influence of cations and anions of the separation properties of macroporous polystyrene-type resins for cephalosporins. **Journal of Chromatography**, Amsterdam, v. 201, p. 287 - 292, nov. 28, 1980.
49. WANG, N. L. Ion exchange in purification. In: ASENJO, J. A. **Separation processes in biotechnology**. New York: Marcel Dekker, 1990. p. 359 - 400.
50. WEAVER, L. E.; CARTA, G. Protein adsorption on cation exchangers: comparison of macroporous and gel - composite media. **Biotechnology Progress**, Washington, v. 12, n. 3, p. 342 - 355, may/june, 1996.
51. YANG, W. Y.; LIN, C. D.; CHU, I. M.; LEE, C. J. Extraction of cephalosporin C from whole broth and separation of desacetyl cephalosporin C by aqueous two-phase partition. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v. 43, n. 6, p. 439 - 445, mar., 1994.