

# PRODUÇÃO DE CLORIDRATO DE DEMECLOCICLINA

**OBJECTIVO:** Aplicação do programa *SuperPro Designer* na simulação de um projecto para a produção de 50 ton/ano de cloridrato de demeclociclina, com um valor comercial estimado de US\$ 110/kg, e respondendo às seguintes questões:

- (i) Divida o diagrama em 3 secções.
- (ii) Construa o “flow-sheet” com base na descrição do processo abaixo.
- (iii) Efectue o balanço de massa com base na composição dos nutrientes em termos de macrocomponentes e equivalência de massa em anexo. Verifique os caudais à saída de cada secção.
- (iv) Construa os diagramas de Gantl e os gráficos de equipamentos.
- (v) Efectue os vários relatórios e exporte para Excel
- (vi) Efectue os cálculos económicos. Considere para isso os parâmetros definidos pelo programa para todos os equipamentos. Analise os resultados para o ano de 2006, supondo que durante os 12 meses de 2005 se efectua a construção e que a vida do projecto é de 10 anos.

## Cloridrato de demeclociclina

A demeclociclina (DCC), também designada por desmetilclorotetraciclina, é um antibiótico da família das tetraciclina e, como tal, com acção de largo espectro microbiano. A DCC é usada, basicamente, como matéria-prima para a produção de um antibiótico de semi-síntese – o cloridrato de minociclina – embora possa ser também usado como antibiótico terapêutico. A produção industrial de cloridrato de demeclociclina (DCC-HCl) faz-se por um processo de biosíntese e compreende 3 estágios: fermentação, extracção e cristalização.

A DCC é um metabolito secundário produzido por fermentação directa, isto é, resultante da cultura aeróbica submersa de estirpes mutantes de *Streptomyces aureofaciens*. A fórmula química da DCC é  $C_{21}H_{21}ClN_2O_8$ , que tem um peso molecular de 464,9 g/mol. O cloridrato correspondente, DCC-HCl, tem fórmula química  $C_{21}H_{22}Cl_2N_2O_8$  e peso molecular 501,3 g/mol.

A DCC, quando em solução aquosa, pode sofrer reacções reversíveis de epimerização, dando origem a um produto menos activo. O grau de extensão desta reacção está directamente relacionado com o tempo de exposição a elevados valores de pH e temperatura, e em presença de iões fosfato ou citrato.

A DCC-HCl é comercializada como um pó amarelo, cristalino e inodoro, com teor máximo de 7,3% em produtos de epimerização. Para além disso, o teor em humidade não pode exceder 4%, usada como matéria-prima para a produção de minociclina.

## Processo de produção de cloridrato de demeclociclina

A produção de DCC-HCl inclui 3 fases principais:

1. **Fermentação:** O microrganismo é cultivado em fermentadores aeróbios onde se produz e excreta uma elevada quantidade de DCC para o meio de cultura.

2. **Extracção:** A DCC é extraída do meio de cultura para uma fase orgânica. Esta fase é precedida de remoção de sólidos suspensos (micélio) do caldo de fermentação, tal e qual, por filtração.
3. **Cristalização:** A DCC é cristalizada na forma de DCC-HCl, por transferência da fase orgânica para uma nova fase aquosa, com HCl. Esta fase engloba também, o processo de lavagem e secagem do produto obtido.

### Pré-fermentação

O processo de fermentação começa pelo desenvolvimento de uma pré-fermentação “seed”, a partir da estirpe liofilizada cultivada em vários estágios laboratoriais e utilizada, por fim na inoculação da pré-fermentação.

O meio de cultura usado na pré-fermentação baseia-se na composição apresentada na tabela 1, esterilizado a 122°C durante 30 minutos. O valor de pH resultante não sofre correcção posterior. A pré-fermentação decorre num fermentador com taxa de ocupação de 75% a 30°C (água de arrefecimento a 5°C) durante cerca de 42 h, tempo suficiente só para a produção de micélio, com pressão de cúpula de 0,6 kg/cm<sup>2</sup> (relativa) e caudal de ar de 0,7 vvm. O ar é fornecido ao pré-fermentador estéril e à pressão de 3 atm (abs). O meio de cultura final tem densidade 1,04kg/m<sup>3</sup> e concentração em micélio de 20 g/ cm<sup>3</sup> (base seca).

*Tabela 1: Constituintes e composição do meio usado na pré-fermentação*

Constituintes	Concentração (g/l)
Licor de maceração do milho (CSL)	40
Dextrina	30
CaCO <sub>3</sub>	10
Pharmamédia	5
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2
Banha de porco	6
Óleo de soja	2
Silicone	0,04

A preparação do meio de cultura para a pré-fermentação consiste na carga de água, nutrientes e sua dissolução por agitação à temperatura ambiente durante tanque agitado. Após transferência do meio para o fermentador, o tanque é limpo (*clean-in-place*) com água a 25°C durante 30 min. A esterilização, não podendo ser simulada no fermentador, é simulada num esterilizador contínuo, a 122°C, durante 30 min, sendo depois arrefecido até 30°C e encaminhado para o pré-fermentador.

O pré-fermentador é então inoculado, durante 5 min com 5 litros de inóculo contendo 100g de biomassa. Ar (25°C e 3 atm) é fornecido por um compressor, sendo previamente esterilizado por um filtro.

O balanço à pré-fermentação baseia-se numa reacção entre os macrocomponentes, sendo consumidos, respectivamente, 63,5% da glucose, 90,5% da proteína e 5,1% dos lípidos inicialmente presentes. O CO<sub>2</sub> formado é eliminado com os gases de escape saturados, que passam através de um filtro esterilizante antes de saírem para a atmosfera.

A entalpia de reacção é -3750 kcal/kg O<sub>2</sub>, a uma temperatura de referência de 30°C. Depois da pré-fermentação e transferência do caldo para o fermentador, considera-se um tempo de limpeza (CIP, *clean-in-place*) de 30 min com água a 30°C.

### Fermentação

A fermentação começa pela preparação do meio de fermentação num tanque à parte, sendo que a composição do meio é a indicada na tabela 2. Efectua-se a carga de água, começa-se a agitação, carregam-se os nutrientes, e promove-se a sua dissolução durante 10 h. O tanque é limpo (CIP) durante 1h com água a 25°C.

*Tabela 2: Constituintes e composição do meio usado na fermentação*

<b>Constituintes</b>	<b>Concentração (g/l)</b>
Amido de milho	60
Dextrina	25
Pharmamédia	22
Caseína	4,25
CaCO <sub>3</sub>	5,1
NH <sub>4</sub> Cl	2
Farinha de soja	12,8
Levedura de cerveja	1
Óleo de soja	24
Banha de porco	11,2
CuSO <sub>4</sub>	0,05
NiSO <sub>4</sub>	0,05
PH inicial = 6,4	

Tal como na pré-fermentação, a esterilização do meio de fermentação é a 122°C durante 30 min, sendo o meio depois transferido para o fermentador, onde é, em seguida inoculado (~15 min) com o conteúdo do pré-fermentador. O volume de inóculo corresponde a 6% do volume final de caldo.

A fermentação não decorre a temperatura constante, mas admite-se uma temperatura média de 27°C. O arejamento será mantido a 0,7 vvm com uma pressão de cúpula de 0,5 kg/cm<sup>2</sup> (rel.). O ar é fornecido ao pré-fermentador estéril e à pressão de 3 atm (abs). A taxa de ocupação do fermentador é de 75% e o tempo de fermentação é de 195h. O pH é controlado por adição de NH<sub>3</sub> (solução a 25% m/m), num total de cerca de 11 litros/m<sup>3</sup> de caldo de fermentação, que é utilizado como fonte de azoto.

Durante a fermentação há também controlo do nível de espuma através da adição de uma mistura, em partes iguais, que se estima em cerca de 16 litros de 6 em 6 horas, entre as 95 e as 195 h de fermentação, mas que se simula como adição desde início.

No final da fermentação atinge-se uma produção de antibiótico (DCC) de 10 kg/m<sup>3</sup> de caldo. A DCC apresenta-se então sob a forma de um complexo de cálcio [(DCC<sup>-</sup>) Ca<sup>2+</sup>, MW 967,9], insolúvel e assim diminui o seu efeito inibitório sobre o microorganismo (conc. de (DCC)<sub>2</sub>Ca=10.4g/l). O meio de cultura tem então uma densidade de 1040 kg/m<sup>3</sup> e contém 45,6 gdcw/l de micélio.

O tempo necessário para as operações de lavagem, carga, esterilização, fermentação e descarga é estimado em cerca de 21 horas, o que perfaz um tempo total de ocupação do fermentador de cerca de 216 h (9 dias).

O balanço à pré-fermentação baseia-se numa reacção entre os macrocomponentes, sendo consumidos, respectivamente, 63,5% da glucose, 100% da amónia e 50% dos lípidos inicialmente presentes. O CO<sub>2</sub> formado é eliminado com os gases de escape saturados, que passam através de um filtro esterilizante antes de saírem para a atmosfera.

A entalpia de reacção é -3750 kcal/kg O<sub>2</sub>, a uma temperatura de referência de 30°C. Depois da pré-fermentação e transferência do caldo para o fermentador, considera-se um

tempo de limpeza (CIP, *clean-in-place*) durante um tempo necessário para perfazer as 21 h de preparação do fermentador consideradas no cálculo do nº de “batches”/ano.

### **Processo de filtração**

O caldo descarregado é recebido num tanque com agitação onde é diluído com água a 5°C (70% V/V CTQ a um caudal de 2000kg/min) para arrefecimento rápido a fim de evitar a formação de epímeros. O caldo é em seguida arrefecido até 15°C, se necessário por intermédio da camisa do tanque. Adiciona-se então adjuvante de filtração (4% m/vol CTQ), operação que dura 30 min, e ácido oxálico desidratado correspondente a 40,5 kg/m<sup>3</sup> de CTQ. Esta adição tem por objectivo descomplexar a DCC que se encontra complexada na forma [(DCC)<sub>2</sub>Ca<sup>2+</sup>] fixando o Ca sob a forma de oxalato insolúvel. A acidificação deve ser rápida (~30 min) para evitar epimerização. Após descarga completa do conteúdo do tanque através do filtro, o tanque é limpo (CIP 30 min com água a 25°C).

A filtração é levada a cabo num filtro rotativo de vácuo, com um fluxo típico médio de 50 litro/m<sup>2</sup>.h. O tempo máximo de filtração é de 16-18h. Os coeficientes de rejeição são de 100% para biomassa, adjuvante, oxalato de Ca e e banha de porco, 30% para a DCC e 0% para os restantes macrocomponentes, que se mantém na fase líquida.

Para aumentar o rendimento global da filtração, o micélio retido no 1º filtro é suspenso em água (na proporção de 1,7 m<sup>3</sup> de água para 1 m<sup>3</sup> de CTQ), novamente acidificado com ácido oxálico 4,5 kg/ m<sup>3</sup> de CTQ) e filtrado noutro filtro rotativo de vácuo, com um fluxo médio típico de 60 50 litro/m<sup>2</sup>.h. Os coeficientes de rejeição desta filtração são iguais aos do 1º filtro.

O bolo de filtração, que contém micélio exausto, adjuvante de filtração e outros insolúveis é enviado para a secção de tratamento de efluentes. Os filtrados de ambos os filtros rotativos são recolhidos num tanque (onde o teor em DCC ser cerca de 2,8 kg/m<sup>3</sup>) sendo o conteúdo resultante arrefecido de novo até 15°C.

### **Processo de extracção**

O conteúdo do tanque de recolha de filtrado é transferido para o tanque de extracção.

A extracção inicia-se pela adição de 2,12%° (m SAQ/v CTQ diluído) de Quartarmin T, 2,9% (m/v CTQ diluído) de NaCl e 20% (v/v filtrado misturado) ou aproximadamente 38,6% (v/v CTQ diluído) de Metil-isobutil-cetona (MIC). O pH desta solução é ajustado a 9,3 usando amónia concentrada (25% m/m), isto é ~5,79% (m/v CTQ diluído). O Quartarmin T (um sal de amónio quaternário) forma com DCC um complexo solúvel em MIC, o que permite a extracção do antibiótico para a fase orgânica. A separação das duas fases é facilitada pelo efeito *salting-out* provocado pela adição de NaCl. A extracção decorre durante 30 min com agitação, após o que se procede à separação, em contínuo, das duas fases, numa centrífuga de discos. O rendimento da extracção é de 90%. A centrifugação decorre durante 18h com um caudal próximo dos 4,8 m<sup>3</sup>/h. A limpeza CIP da centrífuga decorre durante 30 min utilizando-se água a 25°C.

A fase aquosa, que contém água, DCC, componentes solúveis e e MIC (na proporção 9,6% (v/v CTQ diluído) segue para a estação de tratamento de efluentes. A fase orgânica, rica em DCC-SAQ e contendo ainda óleo de soja ou lípidos não removidos na filtração, é tratada durante 30 min, num tanque de recolha, com 20% (v/v MIC) de uma solução de NaCl a 2 g/l a fim de remover algumas impurezas insolúveis que ainda contaminam a fase orgânica. A

separação das fases demora 1h, após a qual descarregam durante 1h as duas fases, sendo que a fase aquosa arrasta 2,5% (v/v) de MIC. O misturador-decantador é lavado (CIP).

A fase orgânica é recolhida num tanque que alimentará um filtro de placas horizontais (*dead-end filtration*), adicionando-se, para isso, 0,5% (m/v) MIC de adjuvante de filtração. Este é 100% retido no filtro, enquanto óleo de soja e MIC são retidos cerca de 1,8%, eliminando-se também, com esta operação, algumas impurezas não quantificadas que tivessem precipitado na interface. A filtração decorre durante 3,5 h com um fluxo de filtração típico de 200 litros/m<sup>2</sup>.h, sendo, no final descarregados os sólidos do filtro e as placas lavadas (total descarga + lavagem ~ 1h).

### **Processo de re-extracção**

O solvente rico, lavado e filtrado, em DCC-SAQ é recebido num tanque de aço esmaltado. A cristalização do antibiótico ocorre após adição de água 6% (v/v) em relação ao volume da fase orgânica e a precipitação inicia-se com a adição de 13 litros de HCl concentrado por cada m<sup>3</sup> de fase orgânica. Esta suspensão de cristais é agitada durante 3h. O ácido descomplexa o antibiótico do sal de amónio quaternário e transfere DCC para a fase aquosa, formando uma solução aquosa sobre-saturada que contém um precipitado de DCC-HCL.

O tempo estabelecido para a descarga da suspensão é de 30 min, sendo os cristais recolhidos num filtro-secador (filtro monoplaca, *Nuttsche filtration*) durante o tempo de descarga do cristalizador. Os cristais são então lavados sucessivamente com 150 litros de MIC e 100 litros de acetona por cada 100 kg de produto, ao longo do total de uma hora. Antes de proceder à descarga do antibiótico, o produto é previamente seco com ar até ficar com uma humidade total de cerca de 30% e uma densidade de 0,7 kg/ m<sup>3</sup>. Os cristais são rejeitados a 100% pelo filtro, acompanhados por 1,1% de água e 25% de acetona, com um rendimento de 99%. O efluente líquido é enviado para o parque de recuperação de solventes.

Os cristais passam a um secador de tabuleiros onde são secos a 50°C até uma humidade (água) inferior a 2%. A operação demora 1h e tem um rendimento de 98%. A acetona é totalmente evaporada.

Por fim os cristais são peneirados para terem um tamanho médio de 250 µm num peneiro vibratório e homogeneizados num misturador bicónico, antes de serem embalados.

O rendimento global do conjunto das operações de cristalização, filtração, secagem, peneiração, homogeneização e embalagem é de 90%.