



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
ESCOLA POLITÉCNICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

ITALLA MEDEIROS BEZERRA

**Estudo dos equilíbrios sólido-líquido presentes na síntese  
enzimática de antibióticos  $\beta$ -lactâmicos**

Salvador – BA  
2016

ITALLA MEDEIROS BEZERRA

**Estudo dos equilíbrios sólido-líquido presentes na síntese enzimática de antibióticos  $\beta$ -lactâmicos**

Tese apresentada à Universidade Federal da Bahia, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Engenharia Química para a obtenção do título de doutor em Engenharia Química.

Orientador: Silvana Mattedi

Co-orientador: Osvaldo Chiavone Filho

Salvador – BA  
2016

A aluna **Italla Medeiros Bezerra** apresentou a sua tese “ESTUDO DOS EQUILÍBRIOS SÓLIDO-LÍQUIDO PRESENTES NA SÍNTESE ENZIMÁTICA DE ANTIBIÓTICOS  $\beta$ -LACTÂMICOS” mostrando conhecimento, segurança e domínio do assunto de seu trabalho, não só na apresentação, mas também na arguição pelos membros da Banca Examinadora. Considerando a qualidade técnica, científica e o conhecimento da candidata a Banca Examinadora APROVA a Defesa da Tese.

**BANCA EXAMINADORA:**

Profa. Dra. Silvana Mettedi e Silva (Orientadora – UFBA)

Prof. Dr. Osvaldo Chiavone Filho (Co-orientador – UFRN)

Prof. Dr. Arnaud Victor dos Santos (UNEB)

Prof. Dr. Marcelo Perencin de Arruda Ribeiro (UFSCar)

Prof. Dr. Luiz Mário Nelson de Góis (UFBA)

Profa. Dr. Regina Ferreira Vianna (UFBA)

## RESUMO

Os antibióticos  $\beta$ -lactâmicos constituem a classe de medicamentos mais prescrita na medicina humana e veterinária. No Brasil, destacam-se entre eles, a amoxicilina e ampicilina, como sendo os dois antibióticos mais consumidos e importados pelo país. A dependência do Brasil por países produtores destes fármacos é decorrente dos inconvenientes causados pela rota química convencional de síntese, que utiliza grande quantidade de solventes tóxicos gerando resíduos não biodegradáveis. Diante disso, a síntese enzimática vem se destacando como uma rota alternativa e “limpa”. Contudo, para esta rota tornar-se economicamente viável e competitiva, é necessário estudar a separação do antibiótico do meio reacional, visto que o mesmo depois de formado encontra-se disponível à degradação hidrolítica, reduzindo o rendimento do processo. A escolha de um agente adequado de separação requer o conhecimento do comportamento dos constituintes nas fases envolvidas em diferentes condições operacionais. Baseado nisso, este trabalho focou na determinação da solubilidade da amoxicilina, ampicilina e seus respectivos subprodutos da síntese enzimática em diferentes condições de temperatura (10 – 25 °C), pH (3 – 8) e concentração de etanol (0 – 70% m/m), usando o método analítico com espectroscopia. Para melhor entendimento destes compostos em solução, foram determinadas as constantes de dissociação de cada um a partir de curvas potenciométricas. Com isso, novos dados de equilíbrio químico e de fases foram apresentados. Os resultados obtidos concordaram com os fundamentos que regem o equilíbrio sólido-líquido entre biomoléculas no que diz respeito à influência do pH, temperatura e solventes orgânicos, e destacam a influência das cargas elétricas em suas propriedades. Além disso, os parâmetros termodinâmicos ( $\Delta H$ ,  $\Delta S$  e  $\Delta G$ ) das reações de dissociação destes compostos em solução foram determinados, indicando que as moléculas protonadas são mais estáveis. Por fim, um modelo termodinâmico considerando a idealidade da solução, e uma modificação do mesmo aplicando a não idealidade foram aplicados para descrever matematicamente as curvas de solubilidade obtidas experimentalmente. Ambos os modelos concordaram com precisão a solubilidade dos compostos nas condições estudadas, exceto nas condições em que a ampicilina apresentou polimorfismo, indicando que em alguns casos a abordagem ideal pode fornecer informações satisfatórias de determinados sistemas, sem a necessidade da estimação de parâmetros.

**Palavras-chave:** Solubilidade, antibiótico  $\beta$ -lactâmico, constante de dissociação, modelagem termodinâmica.

## ABSTRACT

The  $\beta$ -lactam antibiotics constitute the class of most prescribed drugs in human and veterinary medicine. In Brazil, it stands out among them, amoxicillin and ampicillin, as the two most consumed antibiotics and imported by the country. The dependence of Brazil by producing countries of these drugs is due to the disruption caused by conventional chemical synthesis, which uses large amounts of toxic solvents generating non-biodegradable waste. Thus, the enzymatic synthesis has been highlighted as an alternative and "clean" route. However, this route to become economically viable and competitive, it is necessary to consider the separation of the antibiotic from the reaction medium, since even after formed it is subject to hydrolytic degradation, reducing process yield. The choice of a suitable separation agent requires the knowledge of the constituents behavior in the phases involved at different operating conditions. Based on this, this work has focused on determining the solubility of amoxicillin, ampicillin and their by-products of enzymatic synthesis under different temperature (10 – 25 °C), pH (2 – 8) and ethanol concentration conditions (0 – 70% wt) using the spectroscopic analytical method. For a better understanding of these compounds in solution were determined dissociation constants of each from potentiometric curves. Therefore, new chemical and phase data were presented. The results obtained agreed with the fundamentals governing the solid-liquid equilibrium among biomolecules regarding the influence of pH, temperature and organic solvents, and highlight the influence of the electric charges on their properties. Furthermore, the thermodynamic parameters ( $\Delta H$ ,  $\Delta S$  e  $\Delta G$ ) of dissociation reactions of these compounds in solution were determined, indicating that the protonated molecules are more stable. Finally, a thermodynamic model considering the ideal solution, and a modification one thereof by applying the non-ideality were. Both models agreed with accuracy the solubility of the compounds under the conditions studied, except the conditions in which ampicillin showed polymorphism. This means that the ideal approach can provide satisfactory information in some systems, without the need of estimating parameters.

**Keywords:** Solubility,  $\beta$ -lactam antibiotic, dissociation constant, thermodynamic modeling.

*Aos meus pais, irmãs e, em especial, ao meu  
amado esposo, dedico esta tese como  
profundo agradecimento e homenagem por  
todo amor e incentivo.*

## AGRADECIMENTOS

Esta tese é resultado de significativas contribuições que adquiri ao longo dos meus anos de pós-graduação. Assim, tão difícil quanto escrevê-la, foi expressar em palavras meus agradecimentos às pessoas que fizeram parte desta trajetória.

Primeiramente quero agradecer aos professores Silvana Mattedi e Osvaldo Chiavone Filho por confiarem em mim a capacidade de desenvolver este tema, inicialmente tão pouco familiar entre nós. A eles dedico toda a minha admiração e respeito como pessoas e profissionais que os são. Além de orientadores, amigos; eles contribuíram expressivamente para o meu crescimento ético, pessoal e profissional, desempenhando papel fundamental na minha realização como docente na área da Termodinâmica.

Consciente da possibilidade de esquecer alguém, quero registrar meus sinceros agradecimentos a todos os alunos de iniciação científica (Stefan, Alan, Gustavo, Neilson, João Felipe, Silvia e Leila) que assumiram a responsabilidade de desenvolver este trabalho comigo. A contribuição deles foi imensurável. Em coletivo, agradeço também a todos do Núcleo de Pesquisa e Ensino em Petróleo e Gás (NUPEG), em especial ao Laboratório de Fotoquímica e Equilíbrio de Fases (FOTEQ), por toda a estrutura disponibilizada, aos amigos conquistados e aos conhecimentos adquiridos sobre os diversos assuntos, que contribuíram para o enriquecimento desta tese.

São merecidos de agradecimento o Dr. Luís Franco e o Prof. Marcelo Ribeiro, que se propuseram, sem hesitar, em esclarecer as frequentes dúvidas encontradas ao longo do doutorado.

Ao Departamento de Química da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), em especial a Central Analítica e o Núcleo de Processamento Primário e Reúso de Água Produzida e Resíduo (NUPPRAR), além do Laboratório de Caracterização Estrutural de Materiais pertencente ao Departamento de Engenharia de Materiais (DEMat) meu muito obrigada pelas análises de caracterização realizadas.

Sou grata a CAPES, ANP/PRH-14 e Petrobrás (via Cenpes) por todo suporte financeiro concedido em todas as etapas deste doutorado. Não poderia deixar de agradecer ainda Maria Brunet e Maria do Carmo Neves por toda disponibilidade e paciência dispendida mesmo nos momentos de dificuldade, para a aquisição dos materiais necessários.

Destaco ainda a minha gratidão à Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), onde sou docente, por investir na minha qualificação confiando no meu desempenho para a conclusão deste trabalho.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 -	Estrutura geral das penicilinas	21
Figura 2.2 -	Fórmula estrutural da amoxicilina e ampicilina	21
Figura 2.3 -	Perfil de concentração das espécies químicas de um composto com características aminoácidas em função do pH	23
Figura 2.4 -	Balança comercial de produtos farmacêuticos do Brasil entre 2011 e 2015	24
Figura 2.5 -	Síntese cineticamente controlada da ampicilina ou amoxicilina a partir do éster etílico do doador da cadeia lateral (PGE ou HPGE) e ácido 6-aminopenicilânico	26
Figura 4.1 -	Curva de titulação de uma solução de glicina 0,1M a 25°C	41
Figura 4.2 -	Esquema do aparato experimental utilizado para a obtenção das curvas potenciométricas: (1)banho termostático, (2) pHmetro com indicação de temperatura, (3) eletrodo de pH com sensor de temperatura, (4) célula de equilíbrio enjaquetada (5) agitador magnético, (6) titulador automático, (7) cilindro de gás nitrogênio	43
Figura 4.3 -	Análise da curva potenciométrica da amoxicilina em água pura à 25 °C através do método da segunda derivada:(a) Interpolação e ajuste dos dados experimentais, (b) Curvas de primeira e segunda derivada dos dados ajustados	47
Figura 5.1 -	Esquema do aparato experimental utilizado para os ensaios de solubilidade: (1)banho termostático, (2) célula de equilíbrio enjaquetada, (3) agitador magnético, (4) eletrodo de pH com sensor de temperatura, (5) pHmetro com indicação de temperatura	66
Figura 5.2 -	Concentração dos antibióticos em água pura a 25 °C em função do tempo de agitação	69
Figura 5.3 -	Efeito da temperatura inicial da solução no equilíbrio sólido-líquido da ampicilina em água pura a 10 °C	69
Figura 5.4 -	Comparação dos dados experimentais de solubilidade dos compostos com dados disponíveis na literatura em água a 25°C: a) AMOX, b) HPG, c)AMP, d) PG	71
Figura 5.5 -	Dados experimentais de solubilidade dos compostos em temperatura T = 25 °C e pressão atmosférica p = 0,1013 MPa: (a)AMOX, (b)AMP, (c)HPG, (d) PG	73
Figura 5.6 -	Dados experimentais de solubilidade dos compostos em temperatura T = 20 °C e pressão atmosférica p = 0,1013 MPa: (a)AMOX, (b)AMP, (c)HPG, (d) PG	74
Figura 5.7 -	Dados experimentais de solubilidade dos compostos em temperatura T = 15 °C e pressão atmosférica p = 0,1013 MPa: (a)AMOX, (b)AMP, (c)HPG, (d) PG	75
Figura 5.8 -	Dados experimentais de solubilidade dos compostos em temperatura T = 10 °C e pressão atmosférica p = 0,1013 MPa: (a)AMOX, (b)AMP, (c)HPG, (d) PG	76
Figura 5.9 -	Espectros de FTIR das amostras de ampicilina: (a) ampicilina + HCl, (b) ampicilina pura, (c) ampicilina + NaOH	81
Figura 5.10 -	Análise térmica da ampicilina: ampicilina + HCl (linha cinza), ampicilina pura (linha preta), ampicilina + NaOH (linha pontilhada), (a) TG, (b) DSC	81
Figura 5.11 -	Micrografia (1000x) da fase sólida da ampicilina. a) AMP puro, b) AMP + HCl, c) AMP + NaOH	84

Figura B.1 -	Calibração do eletrodo de pH em diferentes temperaturas e composições de etanol	111
Figura C.1 -	Curvas de calibração da amoxicilina (1) em diferentes composições etanol ( $w_2$ ): (a) 0%, (b) 10%, (c) 30%, (d) 50% e (e) 70%	114
Figura C.2 -	Curva de calibração da ampicilina(1) em diferentes composições de etanol( $w_2$ ): (a) 0%, (b) 10%, (c) 30%, (d) 50% e (e) 70%	115
Figura C.3 -	Curvas de calibração da hidroxifenilglicina (1) em diferentes composições etanol ( $w_2$ ): (a) 0%, (b) 10%, (c) 30%, (d) 50% e (e) 70%	116
Figura C.4 -	Curva de calibração da fenilglicina (1) em diferentes composições de etanol( $w_2$ ): (a) 0%, (b) 10%, (c) 30%, (d) 50% e (e) 70%	117
Figura E.1 -	Curvas de solubilidade da amoxicilina a 25 °C, em função do pH e diferentes composições de etanol: (a) 0,0; (b) 0,10; (c) 0,30; (d) 0,50; (e) 0,70	134
Figura E.2 -	Curvas de solubilidade da amoxicilina a 20 °C, em função do pH e diferentes composições de etanol: (a) 0,0; (b) 0,10; (c) 0,30; (d) 0,50; (e) 0,70	135
Figura E.3 -	Curvas de solubilidade da amoxicilina a 15 °C, em função do pH e diferentes composições de etanol: (a) 0,0; (b) 0,10; (c) 0,30; (d) 0,50; (e) 0,70	136
Figura E.4 -	Curvas de solubilidade da amoxicilina a 10 °C, em função do pH e diferentes composições de etanol: (a) 0,0; (b) 0,10; (c) 0,30; (d) 0,50; (e) 0,70	137
Figura E.5 -	Curvas de solubilidade da ampicilina a 25 °C, em função do pH e diferentes composições de etanol: (a) 0,0; (b) 0,10; (c) 0,30; (d) 0,50; (e) 0,70	138
Figura E.6 -	Curvas de solubilidade da ampicilina a 20 °C, em função do pH e diferentes composições de etanol: (a) 0,0; (b) 0,10; (c) 0,30; (d) 0,50; (e) 0,70	139
Figura E.7 -	Curvas de solubilidade da ampicilina a 15 °C, em função do pH e diferentes composições de etanol: (a) 0,0; (b) 0,10; (c) 0,30; (d) 0,50; (e) 0,70	140
Figura E.8 -	Curvas de solubilidade da ampicilina a 10 °C, em função do pH e diferentes composições de etanol: (a) 0,0; (b) 0,10; (c) 0,30; (d) 0,50; (e) 0,70	141
Figura E.9 -	Curvas de solubilidade da hidroxifenilglicina a 25 °C, em função do pH e diferentes composições de etanol: (a) 0,0; (b) 0,10; (c) 0,30; (d) 0,50; (e) 0,70	142
Figura E.10 -	Curvas de solubilidade da hidroxifenilglicina a 20 °C, em função do pH e diferentes composições de etanol: (a) 0,0; (b) 0,10; (c) 0,30; (d) 0,50; (e) 0,70	143
Figura E.11 -	Curvas de solubilidade da hidroxifenilglicina a 15 °C, em função do pH e diferentes composições de etanol: (a) 0,0; (b) 0,10; (c) 0,30; (d) 0,50; (e) 0,70	144
Figura E.12 -	Curvas de solubilidade da hidroxifenilglicina a 10 °C, em função do pH e diferentes composições de etanol: (a) 0,0; (b) 0,10; (c) 0,30; (d) 0,50; (e) 0,70	145
Figura E.13 -	Curvas de solubilidade da fenilglicina a 25 °C, em função do pH e diferentes composições de etanol: (a) 0,0; (b) 0,10; (c) 0,30; (d) 0,50; (e) 0,70	146

- Figura E.14 - Curvas de solubilidade da fenilglicina a 20 °C, em função do pH e diferentes composições de etanol: (a) 0,0; (b) 0,10; (c) 0,30; (d) 0,50; (e) 0,70 147
- Figura E.15 - Curvas de solubilidade da fenilglicina a 15 °C, em função do pH e diferentes composições de etanol: (a) 0,0; (b) 0,10; (c) 0,30; (d) 0,50; (e) 0,70 148
- Figura E.16 - Curvas de solubilidade da fenilglicina a 10 °C, em função do pH e diferentes composições de etanol: (a) 0,0; (b) 0,10; (c) 0,30; (d) 0,50; (e) 0,70 149

## LISTA DE TABELA

Tabela 2.1 - Importações brasileiras de ampicilina e amoxicilina entre 2011 e 2015	25
Tabela 2.2 - Variáveis consideradas no estudo da solubilidade dos diversos compostos, disponível na literatura	28
Tabela 3.1 - Fabricante e pureza dos compostos usados	38
Tabela 4.1 - Concentração das soluções estoque e de NaOH utilizadas para a obtenção das curvas potenciométricas	43
Tabela 4.2 - Constante de dissociação e ponto isoelétrico da amoxicilina em diferentes temperaturas e composição de etanol ( $w_2$ ), à pressão atmosférica $p = 0,1013$ MPa	48
Tabela 4.3 - Constante de dissociação e ponto isoelétrico da ampicilina em diferentes temperaturas e composição de etanol ( $w_2$ ), à pressão atmosférica $p = 0,1013$ MPa	49
Tabela 4.4 - Constante de dissociação e ponto isoelétrico da hidroxifenilglicina em diferentes temperaturas e composição de etanol ( $w_2$ ), à pressão atmosférica $p = 0,1013$ MPa	50
Tabela 4.5 - Constante de dissociação e ponto isoelétrico da fenilglicina em diferentes temperaturas e composição de etanol ( $w_2$ ), à pressão atmosférica $p = 0,1013$ MPa	51
Tabela 4.6 - Variação mínima e máxima do efeito iônico ocasionada nas titulações potenciométricas dos compostos estudados	53
Tabela 4.7 - Variações da entalpia e entropia padrão das reações de dissociação dos grupos ionizáveis	54
Tabela 4.8 - Valores de $pK_a$ da amoxicilina e ampicilina em solução aquosa disponíveis na literatura	57
Tabela 4.9 - Valores de $pK_a$ da hidroxifenilglicina e fenilglicina em solução aquosa e 25 °C disponíveis na literatura	58
Tabela 5.1 - Tempo de agitação utilizado nos ensaios de solubilidade	67
Tabela 5.2 - Principais bandas de absorção das amostras de ampicilina pura e tratada em meio alcalino	83
Tabela 6.1 - Valores dos parâmetros ajustados e GRMSD	90
Tabela 6.2 - Valores de desvio médio absoluto e relativo entre os modelos aplicados e os dados experimentais de solubilidade dos compostos estudados a diferentes temperaturas e composição de etanol	93
Tabela D.1 - Dados experimentais de solubilidade da amoxicilina (1) em misturas de etanol (2) + água (3) à temperatura $T = 25$ °C e pressão atmosférica $p = 0,1013$ MPa	118
Tabela D.2 - Dados experimentais de solubilidade da amoxicilina (1) em misturas de etanol (2) + água (3) à temperatura $T = 20$ °C e pressão atmosférica $p = 0,1013$ MPa	119
Tabela D.3 - Dados experimentais de solubilidade da amoxicilina (1) em misturas de etanol (2) + água (3) à temperatura $T = 15$ °C e pressão atmosférica $p = 0,1013$ MPa	120
Tabela D.4 - Dados experimentais de solubilidade da amoxicilina (1) em misturas de etanol (2) + água (3) à temperatura $T = 10$ °C e pressão atmosférica $p = 0,1013$ MPa	121

Tabela D.5 - Dados experimentais de solubilidade da ampicilina (1) em misturas de etanol (2) + água (3) à temperatura $T = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$ e pressão atmosférica $p = 0,1013\text{ MPa}$	122
Tabela D.6 - Dados experimentais de solubilidade da ampicilina (1) em misturas de etanol (2) + água (3) à temperatura $T = 20\text{ }^{\circ}\text{C}$ e pressão atmosférica $p = 0,1013\text{ MPa}$	123
Tabela D.7 - Dados experimentais de solubilidade da ampicilina (1) em misturas de etanol (2) + água (3) à temperatura $T = 15\text{ }^{\circ}\text{C}$ e pressão atmosférica $p = 0,1013\text{ MPa}$	124
Tabela D.8 - Dados experimentais de solubilidade da ampicilina (1) em misturas de etanol (2) + água (3) à temperatura $T = 10\text{ }^{\circ}\text{C}$ e pressão atmosférica $p = 0,1013\text{ MPa}$	125
Tabela D.9 - Dados experimentais de solubilidade da hidroxifenilglicina (1) em misturas de etanol (2) + água (3) à temperatura $T = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$ e pressão atmosférica $p = 0,1013\text{ MPa}$	126
Tabela D.10 - Dados experimentais de solubilidade da hidroxifenilglicina (1) em misturas de etanol (2) + água (3) à temperatura $T = 20\text{ }^{\circ}\text{C}$ e pressão atmosférica $p = 0,1013\text{ MPa}$	127
Tabela D.11 - Dados experimentais de solubilidade da hidroxifenilglicina (1) em misturas de etanol (2) + água (3) à temperatura $T = 15\text{ }^{\circ}\text{C}$ e pressão atmosférica $p = 0,1013\text{ MPa}$	128
Tabela D.12 - Dados experimentais de solubilidade da hidroxifenilglicina (1) em misturas de etanol (2) + água (3) à temperatura $T = 10\text{ }^{\circ}\text{C}$ e pressão atmosférica $p = 0,1013\text{ MPa}$	129
Tabela D.13 - Dados experimentais de solubilidade da fenilglicina (1) em misturas de etanol (2) + água (3) à temperatura $T = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$ e pressão atmosférica $p = 0,1013\text{ MPa}$	130
Tabela D.14 - Dados experimentais de solubilidade da fenilglicina (1) em misturas de etanol (2) + água (3) à temperatura $T = 20\text{ }^{\circ}\text{C}$ e pressão atmosférica $p = 0,1013\text{ MPa}$	131
Tabela D.15 - Dados experimentais de solubilidade da fenilglicina (1) em misturas de etanol (2) + água (3) à temperatura $T = 15\text{ }^{\circ}\text{C}$ e pressão atmosférica $p = 0,1013\text{ MPa}$	132
Tabela D.16 - Dados experimentais de solubilidade da fenilglicina (1) em misturas de etanol (2) + água (3) à temperatura $T = 10\text{ }^{\circ}\text{C}$ e pressão atmosférica $p = 0,1013\text{ MPa}$	133

## LISTA DE SÍMBOLOS

$a_i$	Atividade da espécie $i$
$C_1$	Parâmetro ajustável
$C_2$	Parâmetro ajustável
$\overline{G}_i^E$	Energia livre de Gibbs molar de excesso da reação de desprotonação do $i$ -ésimo grupo ionizável
$k_B$	Constante de Boltzmann
$K_{a1}$	Constante de equilíbrio de ionização do primeiro grupo ionizável de um composto com características aminoácidas
$K_{a2}$	Constante de equilíbrio de ionização do segundo grupo ionizável de um composto com características aminoácidas
$K_{a3}$	Constante de equilíbrio de ionização do terceiro grupo ionizável de um composto com características aminoácidas
$K_a$	Constante de equilíbrio de um sólido com características aminoácidas
$m_0$	Molalidade das moléculas eletricamente neutras da fase líquida
$m_1$	Concentração do soluto na fase líquida em equilíbrio ou solubilidade experimental, expressa em molalidade
$M$	Número total de conjunto de dados experimental em todas as temperaturas
$N$	Quantidade de resultados experimentais em uma mesma temperatura
$N_A$	Número de Avogadro
$pK_{ai}$	Logaritmo decimal da constante de equilíbrio de ionização do $i$ -ésimo grupo ionizável
$pI$	Ponto isoelétrico
$pH$	Logaritmo decimal da atividade do íon $H^+$
$\Delta pH_{EtOH}$	Correção de pH
$pH_{RVS}$	Valor de referência padrão do pH
$pH_{med}$	Valor de pH medido experimentalmente
$R$	Constante universal dos gases
$R^2$	Coefficiente de correlação linear
$p$	Pressão atmosférica
$S(pH)$	Solubilidade de um componente em um dado pH
$S(pI)$	Solubilidade de um componente no seu ponto isoelétrico
$S_{exp}$	Solubilidade experimental
$S_{calc}$	Solubilidade calculada a partir do modelo termodinâmico

$T$	Temperatura
$u(x)$	Desvio padrão da propriedade $x$
$w_2$	Fração mássica de etanol livre de soluto
$x_i$	Resultado experimental da propriedade $x$
$\bar{x}$	Média aritmética dos resultados experimentais da propriedade $x$
$x_1$	Concentração do soluto na fase líquida em equilíbrio, expressa em molaridade
$[i]$	Concentração da espécie $i$
$\Delta H_i$	Varição de entalpia padrão da reação de dissociação do grupo ionizável $i$
$\Delta S_i$	Varição de entropia padrão da reação de dissociação do grupo ionizável $i$
$\Delta G_i$	Varição da energia livre de Gibbs da reação de dissociação do grupo ionizável $i$
$\Delta s_1$	Varição de entropia molar do estado sólido ao estado padrão
$\Delta h_1$	Varição de entalpia molar do estado sólido ao estado padrão

### ***Letras gregas***

$\alpha^\pm$	Fração de moléculas zwitteriônicas, ou eletricamente neutras
$\alpha^-$	Fração de moléculas aniônicas
$\alpha^+$	Fração de moléculas catiônicas
$f_1^s$ <i>puro</i>	Fugacidade do soluto na fase sólida pura
$f_1^l$	Fugacidade do soluto na fase líquida em equilíbrio
$f_1^\infty$	Fugacidade do soluto na fase líquida padrão (diluição infinita)
$\gamma_i$	Coefficiente de atividade da espécie $i$
$\gamma_{1\pm}$	Coefficiente de atividade das moléculas neutras do soluto
$\gamma_{1-}$	Coefficiente de atividade das moléculas aniônicas do soluto
$\gamma_{1+}$	Coefficiente de atividade das moléculas catiônicas do soluto
$\mu_1^S$	Potencial químico do soluto na fase sólida
$\mu_1^L$	Potencial químico do soluto na fase líquida
$\mu_1^*$	Potencial químico do soluto no estado de referência
$\phi_0(\text{pH})$	Fração de moléculas neutras em um dado pH
$\phi_0(\text{pI})$	Fração de moléculas neutras no ponto isoelétrico
$\lambda_{ij}$	Parâmetro de interação do modelo de Pitzer

$\varepsilon$	Parâmetro de interação entre as moléculas $i$ e $j$
$\rho$	Número de moléculas do componente $j$ por unidade de volume
$\sigma$	Raio de van der Waals

### *Siglas*

6-APA	Ácido 6-aminopenicilânico
AMOX	Amoxicilina
AMP	Ampicilina
DSC	Differential scanning calorimetry (Calorimetria Diferencial de Varredura)
DRX	Difração de Raio-X
FTIR	Fourier Transform Infrared Spectroscopy (Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier)
HPG	Hidroxifenilglicina
GRMSD	Global Root Mean Square Deviation
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
PG	Fenilglicina
RMSD	Root Mean Square Deviation

## SUMÁRIO

<b>CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO</b>	<b>18</b>
<b>CAPÍTULO 2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	<b>21</b>
<b>2.1 Penicilinas semissintéticas</b>	<b>21</b>
2.1.1 Classificação	21
2.1.2 Ionização	23
<b>2.2 Consumo das penicilinas semissintéticas no Brasil</b>	<b>24</b>
<b>2.3 Síntese enzimática das penicilinas semissintéticas</b>	<b>26</b>
<b>2.4 Solubilidade dos antibióticos e seus subprodutos</b>	<b>28</b>
<b>2.5 Propriedades anfóteras das penicilinas semissintéticas</b>	<b>30</b>
<b>2.6 Modelagem termodinâmica</b>	<b>33</b>
2.6.1 Equações de estado	34
2.6.2 Modelos de $G^E$	34
2.6.3 Modelos aplicados a sistemas contendo moléculas com características aminoácidas	35
<b>CAPÍTULO 3 – DESCRIÇÃO DOS MATERIAIS UTILIZADOS</b>	<b>39</b>
<b>3.1 Reagentes</b>	<b>39</b>
<b>3.2 Equipamentos</b>	<b>39</b>
<b>CAPÍTULO 4 - EQUILÍBRIO QUÍMICO DE BIOMOLÉCULAS</b>	<b>41</b>
<b>4.1 Introdução</b>	<b>41</b>
<b>4.2 Curva potenciométrica de biomoléculas</b>	<b>41</b>
<b>4.3 Metodologia experimental</b>	<b>43</b>
4.3.1 Obtenção das curvas potenciométricas	43
4.3.2 Determinação experimental das constantes de ionização	45
<b>4.4 Resultados e discussão</b>	<b>47</b>
4.4.1 Efeito da temperatura	54
4.4.2 Efeito do solvente	56
4.4.3 Comparação com a literatura	57
<b>4.5 Considerações parciais</b>	<b>59</b>
<b>CAPÍTULO 5 – EQUILÍBRIO SÓLIDO-LÍQUIDO DE BIOMOLÉCULAS: EXPERIMENTAL</b>	<b>61</b>
<b>5.1 Introdução</b>	<b>61</b>

<b>5.2 Equilíbrio sólido-líquido de moléculas com características aminoácidas</b>	<b>61</b>
<b>5.3 Fatores que influenciam a solubilidade de moléculas com características aminoácidas</b>	<b>64</b>
5.3.1 Efeito do pH	64
5.3.2 Efeito da Temperatura	65
5.3.3 Efeito da força iônica	65
5.3.4 Efeito de solventes orgânicos	66
<b>5.4 Metodologia experimental</b>	<b>67</b>
<b>5.5 Resultados e discussão</b>	<b>68</b>
5.5.1 Tempo de agitação	68
5.5.2 Validação da metodologia	71
5.5.3 Resultados experimentais	73
<b>5.6 Considerações parciais</b>	<b>85</b>
<b>CAPÍTULO 6 – MODELAGEM TERMODINÂMICA DOS ANTIBIÓTICOS <math>\beta</math>-LACTÂMICOS E SEUS SUBPRODUTOS</b>	<b>87</b>
<b>6.1 Introdução</b>	<b>87</b>
<b>6.2 Desenvolvimento teórico dos modelos utilizados</b>	<b>87</b>
<b>6.3 Resultados e discussão</b>	<b>90</b>
<b>6.4 Considerações parciais</b>	<b>95</b>
<b>CAPÍTULO 7 – CONCLUSÕES</b>	<b>96</b>
<b>SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS</b>	<b>98</b>
<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>99</b>
<b>APÊNDICE A – ARTIGOS PUBLICADOS</b>	<b>110</b>
<b>APÊNDICE B – CURVA DE CALIBRAÇÃO DO ELETRODO DE PH</b>	<b>112</b>
<b>APÊNDICE C – CURVAS DE CALIBRAÇÃO DO ESPECTROFOTÔMETRO</b>	<b>114</b>
<b>APÊNDICE D – RESULTADOS EXPERIMENTAIS DE SOLUBILIDADE</b>	<b>119</b>
<b>APÊNDICE E – CORRELAÇÃO DOS RESULTADOS EXPERIMENTAIS DE SOLUBILIDADE</b>	<b>135</b>

## CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO

A descoberta de medicamentos capazes de combater doenças infecciosas constitui uma das maiores realizações da humanidade, destacando dentre eles os antibióticos. Estes quando descobertos diminuíram drasticamente a mortalidade causada por infecções, melhorando a expectativa de vida da população. Atualmente, o antibiótico é a classe de medicamentos mais prescrita na medicina humana e veterinária; dos quais os  $\beta$ -lactâmicos, especialmente as penicilinas e cefalosporinas, ocupam lugar de destaque pelo fato de que juntas somam a maior quantidade de produtos biotecnologicamente produzidos no mundo.

Segundo dados da Associação Brasileira da Indústria Farmoquímica e de Insumos Farmacêuticos (ABIQUIFI, 2016), em 2015 foram investidos aproximadamente US\$ 5913 milhões em medicamentos, destacando-se a amoxicilina como sendo o antibiótico mais importado pelo país. Juntamente com a ampicilina, no mesmo ano as importações destes dois antibióticos juntos alcançaram 44,4 milhões de dólares FOB, com a amoxicilina correspondendo a mais de 95% desse montante (ALICEWEB, 2016).

Apesar da maioria dos antibióticos que são usados hoje ter mais de 30 anos, os processos que são utilizados na sua produção ainda requerem melhorias significativas, sendo estes os motivos da inviabilidade de plantas de produção no Brasil. A produção enzimática de antibióticos  $\beta$ -lactâmicos semissintéticos vem adquirindo cada vez mais relevância a fim de evitar os inconvenientes dos processos químicos convencionais. Todavia, na reação enzimática ocorrem duas outras reações indesejadas, além da síntese. Devido a esse conjunto de reações serie-paralelo, na síntese enzimática da amoxicilina e ampicilina o meio reacional resulta na mistura de vários constituintes: o substrato (éster ou amida da cadeia lateral), o núcleo básico das penicilinas, álcool e o doador direto da cadeia lateral. O álcool é um subproduto gerado tanto na reação de síntese quanto hidrólise do antibiótico depois de formado; e seu tipo depende exclusivamente do substrato utilizado na reação. Já o doador direto da cadeia lateral é subproduto da reação decorrente da hidrólise do substrato.

Em consequência da diversidade de variáveis que podem influenciar esta rota de produção, é necessária uma apreciação cautelosa dos inúmeros fatores que estão envolvidos, incluindo as propriedades da enzima, dos substratos e do sistema reacional. Cada uma das variáveis que define o meio reacional (pH, temperatura, força iônica do meio, efeitos inibitórios dos substratos e produtos, presença de solventes orgânicos como cossolventes, concentração de reagentes, entre outros) tem efeitos diferentes sobre cada um dos parâmetros.

Estudos reportam que a separação do antibiótico do meio reacional é fundamental para evitar as reações hidrolíticas, aumento o rendimento da reação, citando a cristalização como etapa promissora na separação do produto do meio reacional. Entretanto, esse parâmetro é pouco conhecido, ou disponível, na literatura para uma gama de antibióticos, principalmente para amoxicilina e ampicilina.

Pensando nisso, o presente trabalho tem como objetivo geral avaliar simultaneamente o efeito do pH, temperatura e presença de álcool na cristalização da amoxicilina e ampicilina, bem como dos subprodutos correspondentes à hidrólise do substrato. Este estudo inclui desde a especiação das moléculas iônicas a partir do equilíbrio químico, até a elucidação do equilíbrio de fases envolvido. Sabendo que o conhecimento experimental e teórico da solubilidade dos antibióticos é essencial para otimizar a produção e purificação destes compostos, esta tese constitui ferramenta fundamental para trabalhos futuros de projeto e otimização da síntese enzimática da amoxicilina e ampicilina, tanto no meio científico quanto na aplicação tecnológica.

Para isso, foram determinados novos dados de solubilidade destes compostos a partir do método analítico de saturação, variando o pH de 2 a 8, numa faixa de temperatura entre 10 e 25 °C em misturas água+etanol contendo 0, 10, 30, 50 e 70% (m/m) de etanol. As faixas de pH e temperatura adotadas neste trabalho basearam-se na informação de que a enzima apresenta alta atividade catalítica em pH neutro e condições amenas de temperatura. A ausência de dados disponíveis na literatura sobre a solubilidade destes compostos em meio aquoso contendo etanol foi responsável pela realização pioneira desse estudo, abrangendo desde água pura até 70% (m/m), embora concentrações elevadas de álcool não sejam encontradas industrialmente.

Os compostos estudados neste trabalho apresentam fórmulas estruturais peculiares responsáveis por várias de suas características. Dentre elas, destaca-se a capacidade de se apresentar em diferentes formas iônicas em solução, apresentando efeitos significativos na solubilidade do composto. Devido a isso, a titulação potenciométrica com o método da segunda derivada foi utilizada para determinar as constantes de dissociação da amoxicilina, ampicilina e seus subprodutos da reação de síntese enzimática em misturas de água + etanol variando de 0 a 70% em massa de etanol, variando a temperatura de 10 a 25 °C. Com isso foi possível observar o comportamento das diferentes espécies iônicas em diferentes condições operacionais.

Considerando que o comportamento de fases de soluções aquosas contendo aminoácidos tem sido exaustivamente estudado, os modelos termodinâmicos desenvolvidos

para a descrição desses sistemas constituem o ponto de partida para a descrição da solubilidade dos compostos de interesse nesse trabalho, visto que as cadeias laterais funcionais dos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos são comparáveis com as cadeias laterais funcionais dos aminoácidos. Assim, os modelos termodinâmicos permitirão gerar estimativas teóricas da solubilidade em faixas mais amplas de temperatura, pressão e composição, enquanto utilizando uma quantidade menor de informações experimentais (MOTA *et al.*, 2011). Duas abordagens matemáticas propostas na literatura para a modelagem de proteínas foram aplicadas na correlação das curvas de solubilidade obtidas experimentalmente, apresentando grande capacidade preditiva para os sistemas estudados.

Alguns dos resultados obtidos neste trabalho foram enfoque de dois trabalhos publicados recentemente, conforme apresentado no Apêndice A.

## CAPÍTULO 2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

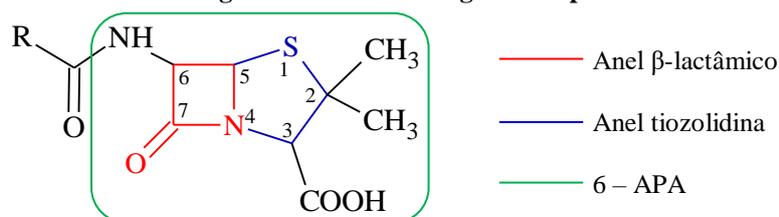
### 2.1 Penicilinas semissintéticas

#### 2.1.1 Classificação

A primeira definição de antibiótico surgiu em 1940 como sendo produtos metabólicos de microrganismos que apresentam a capacidade de inibir o crescimento e até de destruir outros microrganismos. Na busca por novos antibióticos, tornou-se evidente que essas substâncias podem ser produzidas por outros organismos, além de micróbios, como: algas, líquens, plantas verdes e até células animais (KOROLKOVAS, 1982; MENDES, 2004). Entretanto, a obtenção de antibióticos semissintéticos ou modificados com melhorias nas propriedades farmacológicas levou a seguinte definição: antibióticos são substâncias químicas específicas derivadas de microrganismos vivos ou produzidas por eles, bem como seus análogos estruturais obtidos artificialmente por síntese, capazes de inibir processos vitais de outros microrganismos causadores de infecções, mesmo em concentrações diluídas (KOROLKOVAS, 1982; GOODMAN e GILMAN, 2003).

A penicilina representa o marco na era dos antibióticos, pois foi a primeira substância descoberta com características antimicrobiana. Segundo Ferreira (2004), sua estrutura corresponde a um anel tiazolidina fundido a um anel  $\beta$ -lactâmico, uma carboxila em 3, duas metilas em 2 e uma cadeia lateral variável ligada ao sistema bicíclico na posição 6 através do grupo acilamino, conforme mostrado na Figura 2.1. O núcleo comum a todas as penicilinas é denominado ácido 6-aminopenicilânico (6-APA) e, apesar de ser biologicamente inativo, constitui o principal requisito estrutural para a atividade biológica. Logo, a transformação metabólica ou a ocorrência de uma alteração química nessa porção da molécula leva a perda de toda a atividade antibacteriana. Já a cadeia lateral (radical R) é responsável por dar o nome à penicilina e determina muito de suas características antibacterianas e farmacológicas: a estabilidade em meio ácido, fundamental para a atividade por via oral destes fármacos; a estabilidade frente às  $\beta$ -lactamases; e o espectro de ação frente às bactérias Gram-negativas (GOODMAN e GILMAN, 2003; GUIMARÃES *et al.*, 2010; LEITE, 2009).

Figura 2.1 – Estrutura geral das penicilinas

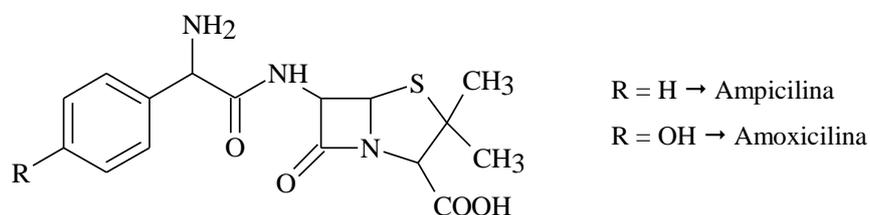


Fonte: Adaptado de FERREIRA (2004).

Devido a algumas limitações apresentadas pelas penicilinas naturais (produzidas totalmente por microrganismos), surgiu o interesse por novas substâncias que apresentassem a mesma atividade antibacteriana, porém com tais características melhoradas. Logo surgiram novos derivados de penicilinas partindo do 6-APA por meio de reações de acilação, esterificação, amidação e hidroxiamidação, entre outros (CREA *et al.*, 2012). Esses antibióticos derivados de processos químicos são denominados penicilinas semissintéticas, e apresentam vantagens farmacocinéticas quando comparados com as penicilinas naturais (LEITE, 2009; PELCZAR JR. *et al.*, 1996).

A amoxicilina (AMOX) e a ampilina (AMP) são exemplos de antibióticos semi-sintéticos derivados da penicilina, ambos classificados como aminopenicilinas devido à presença do grupo amino adjacente à carbonila do N-acil da cadeia lateral, segundo a Figura 2.2. Eles estão estreitamente relacionados entre si do ponto de vista químico e farmacológico, por apresentarem semelhança em suas fórmulas estruturais.

Figura 2.2 – Fórmula estrutural da amoxicilina e ampilina



Fonte: Autor.

A extensão da atividade destes antibióticos é atribuída ao grupo amino, supostamente responsável pelo poder de penetração na parede celular por parte destas penicilinas. Assim, ambos são antibióticos de amplo espectro, essencialmente idênticos. Por apresentar o grupo amino ionizável, a nucleofilicidade do oxigênio carbonílico responsável pela hidrólise do anel bicíclico e desativação do fármaco é menor, aumentando dessa maneira a estabilidade em meio ácido (ZAWOROTKO *et al.*, 2006). No entanto, a amoxicilina é geralmente o fármaco

mais escolhido dentro da classe, por ser melhor absorvido do que outros antibióticos  $\beta$ -lactâmicos (CREA *et al.*, 2012).

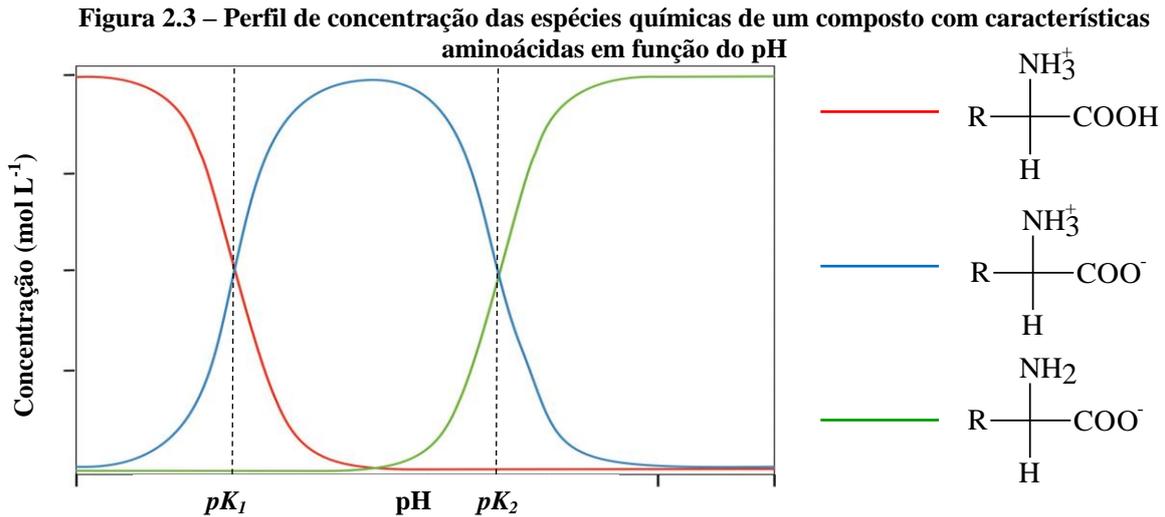
### 2.1.2 Ionização

A maior atividade química e biológica dos antibióticos é proveniente da presença de inúmeros grupos funcionais em uma mesma molécula, entre eles ácido carboxílico, amida, amina, álcool, cetona, enol, fenol, tiazol, nitro composto, derivados halogenados, sulfonamida, entre outros. Isso ocasiona a presença de inúmeros sítios de ionização em sua estrutura e, conseqüentemente, mais de um estado de ionização com diferentes cargas líquidas (SANDLER, 2006).

A amoxicilina e ampicilina apresentam em sua estrutura os grupos amino e carboxila simultaneamente, semelhante aos aminoácidos e proteínas; ou seja, coexistem espécies ácidas e básicas na mesma molécula. Isso significa que possuem dois sítios de ionização passíveis de sofrer protonação (adição de H) e desprotonação (retirada de H) (RUDOLPH *et al.*, 2001; SANTANA *et al.*, 2010). Como normalmente os grupos químicos possuem afinidades diferentes por prótons e, conseqüentemente, constantes de ionização diferentes, em solução estas moléculas liberam prótons da carboxila e os recebem na amina. Assim, os grupos amino e carboxila são quase completamente ionizados, formando uma molécula eletricamente neutra, porém com ambas as partes aniônicas e catiônicas simultaneamente. Esses compostos eletricamente neutros, porém com a presença de cargas opostas devido à ionização dos grupos funcionais, são chamados de zwitterions.

Além desta espécie, outras formas iônicas são encontradas em maior ou menor proporção dependendo do pH da solução e da natureza do composto. Na presença de um grupo doador de prótons, isto é, em baixos valores de pH, o grupo carboxila ganha um próton prevalecendo na solução a forma positivamente carregada, ou seja, totalmente protonada. No entanto, em valores elevados de pH decorrente da presença de agentes receptores de prótons, o grupo amino perde um próton prevalecendo então a forma negativamente carregada. A forma zwitteriônica existe predominantemente numa condição de pH intermediária à existência das formas positiva e negativa da molécula, denominado ponto isoelétrico.

A Figura 2.3 ilustra, de maneira generalizada, a concentração das espécies químicas em função do pH para um composto que apresenta características aminoácidas. O conhecimento destas características torna-se imprescindível para auxiliar a etapa de purificação na síntese de antibióticos.

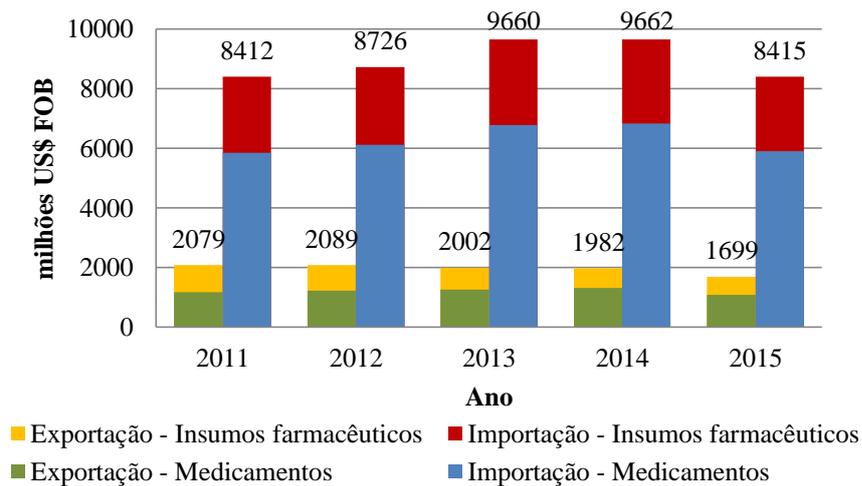


Fonte: Adaptado de BEZERRA (2012).

## 2.2 Consumo das penicilinas semissintéticas no Brasil

Em 1949, os EUA eram os maiores produtores de antibióticos, com uma produção anual de aproximadamente 83 toneladas de penicilina G sódica. Em 1982, a produção mundial de penicilina era maior que 12.000 toneladas, sendo a Europa a maior produtora. Em 1995, a produção mundial era de aproximadamente 33.000 toneladas, um aumento de cinco vezes em relação à década de 60 (FERREIRA, 2004).

No Brasil e na América Latina, as décadas de 80/90 corresponderam à abertura do mercado e ao reconhecimento de patentes internacionais de fármacos, o que levou a uma diminuição considerável do parque industrial farmacêutico. Considerando a cadeia produtiva farmacêutica brasileira, não existe integração entre os fármacos e os respectivos medicamentos devido à inexistência de plantas de produção dos princípios ativos no país. Apesar do grande número de laboratórios, a dependência da importação de medicamentos descreve o cenário atual do país, representado na Figura 2.4 pela balança comercial brasileira dos últimos cinco anos.

**Figura 2.4 – Balança comercial de produtos farmacêuticos do Brasil entre 2011 e 2015**

A rota de produção convencional das penicilinas semissintéticas foi estabelecida nos anos 60 por via química em um complexo processo que exige diversas etapas de proteção e desproteção dos grupos ativos para evitar reações de hidrólise não seletiva. Para isso, é necessário o uso de solventes organoclorados tóxicos, temperaturas reacionais muito baixas ( $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) e longo tempo de reação, gerando grande quantidade de resíduos não biodegradáveis (GONÇALVES *et al.*, 2000; LEITE, 2009; OSPINA *et al.*, 1996; SIQUEIRA *et al.*, 2005). As regulamentações ambientais cada vez mais exigentes justificam possivelmente a ausência de plantas de produção no Brasil, tendo que importar integralmente todos os princípios ativos dos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos de países como Índia, China e Venezuela, onde as regulamentações ambientais ainda são menos restritas (PÁDUA, 2008; RIBEIRO, 2007; SANTANA, 2007; VIEIRA, 2003).

Segundo a ABIQUIFI (2016), nos últimos três anos a amoxicilina ocupou o terceiro lugar dentre os insumos farmacêuticos mais importados, ficando atrás somente da insulina e do acetato de alfa-tocoferol (vitamina E). Esta posição correspondeu à 11, 13 e 15% do total gasto entre os dez produtos mais importados em 2013, 2014 e 2015, respectivamente. Juntamente com a ampicilina, na classe dos antibióticos eles são os dois fármacos mais consumidos do Brasil. Na Tabela 2.1 é possível observar a evolução dos índices de importação destes antibióticos no país nos últimos cinco anos, segundo dados do Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comercio Exterior; e perceber sua grande importância não apenas na área da saúde, mas também na economia do Brasil.

**Tabela 2.1** - Importações brasileiras de ampicilina e amoxicilina entre 2011 e 2015

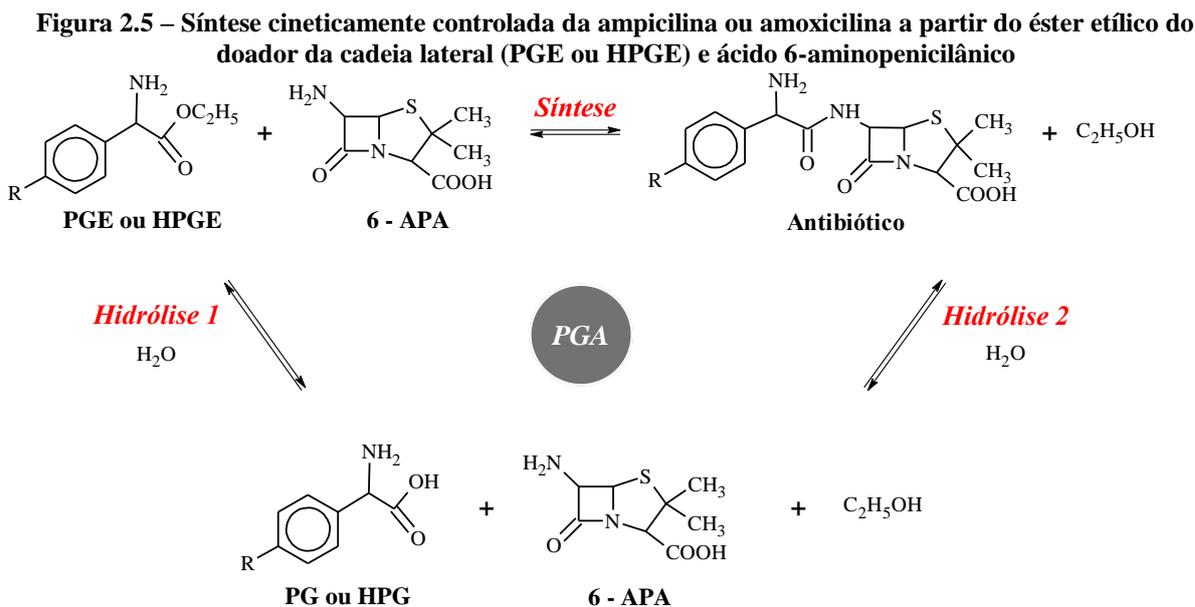
Ano	Amoxicilina		Ampicilina	
	US\$ FOB (Milhões)	Quant. (Toneladas)	US\$ FOB (Milhões)	Quant. (Toneladas)
2011	34,8	1161,6	2,3	44,7
2012	28,7	1028,3	2,9	65,0
2013	37,2	1273,9	1,7	39,5
2014	49,5	1606,5	1,5	34,1
2015	42,3	1487,3	2,1	39,3

Fonte: Sistema de Análise das Informações de Comércio Exterior (ALICEWEB, 2016).

A partir dos anos 90, um intenso esforço tem sido direcionado para um bioprocessamento que esteja em conformidade com as crescentes restrições ambientais. Surgiu então a síntese enzimática, que objetiva promover a condensação entre o núcleo das penicilinas e uma cadeia lateral modificada (o doador acila) em meio preferencialmente aquoso, pH neutro e temperatura moderada, resultando em uma rota alternativa mais limpa e atrativa quando comparada à síntese química (FERNÁNDEZ-LAFUENTE *et al.*, 1998; GIORDANO *et al.*, 2006; SCHROËN *et al.*, 1999).

### 2.3 Síntese enzimática das penicilinas semissintéticas

A síntese enzimática das penicilinas semissintéticas trata-se de utilizar uma enzima como transferase na reação de síntese, permitindo dessa maneira a produção de antibióticos com drástica redução das etapas de processamento (SCHROËN *et al.*, 1999). Esse processo é geralmente catalisado pela penicilina G acilase (PGA) e requer o uso de derivados ativos dos doadores da cadeia lateral, podendo ser éster ou amida, para promover a acilação do núcleo  $\beta$ -lactâmico e liberar o antibiótico em adição ao álcool ou amônia. A Figura 2.5 ilustra o processo de síntese da ampicilina ou amoxicilina através dessa estratégia, utilizando como doador acila um éster etílico.



Fonte: Adaptado de SIQUEIRA *et al.* (2005).

Nesta abordagem, a enzima promove o ataque nucleofílico direto ao carbono da carbonila nas ligações amida ou éster. No entanto, a PGA atua tanto como uma transferase como uma hidrolase, e moléculas de água atuam como um nucleófilo concorrente ao núcleo  $\beta$ -lactâmico para o ataque nucleofílico ao intermediário acil-enzima (GIORDANO *et al.*, 2006; YOUSKO *et al.*, 2000). Assim, o rendimento da reação depende diretamente das propriedades catalíticas da enzima utilizada, além do balanço de três reações catalisadas simultaneamente por ela: a síntese do antibiótico (AMOX ou AMP), na qual uma ligação acil-amida é formada; a hidrólise da ligação éster do doador acila ativado (Hidrólise 1), resultando na formação do subproduto correspondente (HPG ou PG); a hidrólise da ligação acil-amida do antibiótico previamente sintetizado (Hidrólise 2). Conseqüentemente, a mistura reacional consiste de quatro componentes (antibiótico, o 6 – APA, o agente de acilação e o subproduto correspondente). (FERNÁNDEZ-LAFUENTE *et al.*, 1996; HERNÁNDEZ-JÚSTIZ *et al.*, 1999, KUROCHKINA *et al.*, 2011).

Se todas as reações ocorrerem até que o equilíbrio seja alcançado, é obtida baixa concentração do antibiótico. No entanto, se a reação for interrompida antes que a hidrólise do antibiótico predomine sobre a sua formação, um maior rendimento será obtido (SCHROËN *et al.*, 1999). Logo, o processo recai em um problema clássico de otimização, onde o interesse concentra-se no produto intermediário de um conjunto de reações série-paralela. Para um bom desempenho, o projeto deve ser direcionado para favorecer o processo de síntese e reduzir os hidrolíticos.

O meio acadêmico tem concentrado esforços para aperfeiçoar a síntese enzimática de antibióticos  $\beta$  – lactâmicos através de ferramentas fundamentais que compõem a engenharia enzimática, ou seja, investigação de diferentes condições reacionais (engenharia de reação), projeção de diferentes biocatalisadores (engenharia do catalisador) e avaliação dos tipos de reatores enzimáticos (engenharia do reator). Isso porque qualquer modificação no derivado da enzima, na fonte da enzima, no tipo de imobilização ou nas condições de reação pode acarretar uma variação nas velocidades de reação e, por conseguinte, uma alteração no rendimento máximo, segundo relatado por Pádua (2008).

Por isso, a viabilidade econômica desta rota é determinada pela otimização das condições operacionais que permitam obter simultaneamente valores elevados para um grande número de parâmetros industriais: rendimento, atividade e estabilidade da enzima, concentração e estabilidade do substrato e produto, e assim por diante (FERNÁNDEZ-LAFUENTE *et al.*, 1991). Na literatura estão disponíveis inúmeros trabalhos que avaliaram os parâmetros cinéticos destes processos. Entretanto, estudar o processo reacional da síntese enzimática não pertence ao escopo deste trabalho, mas sim fornecer dados termodinâmicos visando a cristalização dos antibióticos depois de formado.

#### **2.4 Solubilidade dos antibióticos e seus subprodutos**

Embora a enzima se encontre imobilizada em suportes insolúveis, a reação enzimática para a produção de antibióticos semissintéticos ocorre na fase líquida aquosa. Uma alternativa para aumentar o rendimento e seletividade, tornando o processo enzimático economicamente competitivo com a rota convencional, é retirar o antibiótico, depois de formado, do meio aquoso reacional. Assim, removendo-o da fase líquida, o mesmo torna-se indisponível ao ataque enzimático, prevenindo sua hidrólise. Devido à baixa solubilidade de alguns produtos e subprodutos da reação enzimática, uma parte deles encontra-se também presente na mistura de reacional como precipitados.

Diversos estudos vêm sendo desenvolvidos a fim de determinar o método mais eficaz de obtenção desses antibióticos na sua forma pura depois de formado. A extração envolvendo solventes voláteis tem sido amplamente utilizada para a recuperação de biomoléculas (VAN BERLO *et al.*, 1997). Devido às restrições ambientais, na última década, solventes alternativos despertaram o interesse da sociedade acadêmica e industrial. Neste contexto pode-se citar a extração líquido-líquido entre duas fases aquosas, como sugerido por Hernández-Justiz *et al.* (1998) para a síntese de cefalexina; ou líquidos iônicos, conforme

sugerido por Manic e Najdanovic-Visak (2012) para a recuperação da eritromicina. Pode-se também separar antibióticos reduzindo as reações de hidrólise com o uso de cossolventes como proposto por Illanés e Fajardo (2001) e Illanes *et al.* (2002) para a síntese de ampicilina e por Aguirre *et al.* (2002) para a síntese de cefalexina. Além da utilização de resinas poliméricas, conforme proposto por Dutta *et al.* (1999) para a separação e purificação do ácido 7 aminocefalosporânico, cefalexina e cefadroxila. Todavia, o método que mais vem se destacando na literatura para a separação e concentração de biomoléculas é a cristalização, como sugerido por Youshko *et al.* (2000) para a síntese da ampicilina. Logo percebe-se que o conhecimento da solubilidade de todos os componentes presentes no meio reacional é essencial para a separação e purificação de antibióticos.

A solubilidade da amoxicilina e ampicilina, além dos compostos presentes na reação de síntese enzimática destes antibióticos já foi foco de várias pesquisas (BEZERRA *et al.* 2013; CREA *et al.*, 2012; DIENDER *et al.*, 1998; RUDOLPH *et al.*, 1999; RUDOLPH *et al.*, 2001; SANTANA *et al.*, 2010; SU *et al.*, 2007; VIEIRA, 2003; YOUSHKO *et al.*, 2000). Nesses trabalhos, diferentes abordagens foram usadas para estudar a solubilidade e sua dependência com vários fatores, tais como solvente, temperatura, presença de diferentes eletrólitos e forças iônicas, de acordo com a Tabela 2.2. Porém, a maioria deles não considera o efeito simultâneo de duas ou mais variáveis, tornando os resultados limitados a poucas condições operacionais.

**Tabela 2.2 – Variáveis consideradas no estudo da solubilidade dos diversos compostos, disponível na literatura**

	pH	Temperatura	Cossolvente	Força iônica
AMOX	(a) <sup>1</sup> , (b) <sup>1</sup> , (c), (g)	(a) <sup>2</sup> , (g)	(b)	(f)
AMP	(a) <sup>1</sup> , (b) <sup>1</sup> , (e)	(a) <sup>2</sup> , (e)	(b)	(f)
HPG	(a) <sup>1</sup> , (c), (g)	(a) <sup>2</sup> , (g)	(b)	-
PG	(a) <sup>1</sup> , (e)	(a) <sup>2</sup> , (e)	(b)	-
6-APA	(a) <sup>1</sup> , (b) <sup>1</sup> , (c), (e)	(a) <sup>2</sup> , (e)	(b)	(d)

<sup>1</sup>T = 25 °C; <sup>2</sup>pH = pI: (a) RUDOLPH *et al.*, 1999; (b) RUDOLPH *et al.*, 2001; (c) DIENDER *et al.*, 1998; (d) SU *et al.*, 2007; (e) SANTANA *et al.*, 2010; (f) CREA *et al.*, 2012; (g) BEZERRA *et al.*, 2013.

Apesar de a solubilidade de antibióticos  $\beta$ -lactâmicos semi-sintéticos e seus precursores ser pouco estudada, o comportamento de fases de aminoácidos e proteínas é um assunto bastante difundido no meio acadêmico, servindo como referência para o desenvolvimento deste trabalho

Brown e Rousseau (1994), Carta (1998), Lee *et al.*, (2013), Pradhan e Vera (1998) e Tseng *et al.* (2009) estudaram o efeito do pH na solubilidade de vários aminoácidos. Todos os autores identificaram a solubilidade mínima no ponto isoelétrico.

Peregrine e Gasparetto (2005) realizaram um estudo integrado dos efeitos da temperatura e do pH sobre a solubilidade de proteínas do soro do leite. Além deles, vários autores relataram dados de solubilidade de aminoácidos e proteínas em meio aquoso em diferentes temperaturas (CHRISTOPHER *et al.*, 1998; DALDRUP *et al.*, 2010; PETSEV *et al.*, 2001; ROMERO e OVIEDO, 2013)

Mota *et al.* (2009) determinaram experimentalmente a solubilidade de alguns medicamentos entre 25 e 42°C em água e cinco solventes orgânicos. Essa mesma associação entre temperatura e composição de solventes foi estudada por Dománska *et al.* (2011), Ferreira *et al.* (2004 e 2008), Forte *et al.* (2012), Gandhi e Murthy (2012), Gude *et al.* (1996), Pobudkowska *et al.* (2015) e Zhang *et al.* (2016) em biomoléculas com características aminoácidas.

Granberg e Rasmuson (1999) determinaram a solubilidade do paracetamol em 26 solventes puros. E em 2006, Ruckenstein e Shulgin focaram na associação de cossolventes e eletrólitos em soluções aquosas para investigar a solubilidade de proteínas.

Su *et al.* (2007) estudaram a solubilidade do 6-APA em diferentes forças iônicas. E Ferreira *et al.* (2007) e Held *et al.* (2014) investigaram o efeito de eletrólitos na solubilidade de aminoácidos.

## 2.5 Propriedades anfóteras das penicilinas semissintéticas

Em 1923, Brønsted e Lowry definiram ácidos e bases como sendo substâncias capazes de doar prótons e receber prótons, respectivamente. Segundo esta definição, em uma reação (Reação 1) ácido-base tem-se:



A reação de dissociação mostrada anteriormente é caracterizada por uma constante de equilíbrio que, para uma reação ácido-base, é conhecida como constante de dissociação ( $K_a$ ). Esta é uma grandeza que representa a tendência de um ácido doar um próton para um solvente.

Moléculas com características aminoácidas em solução aquosa agem como ácido e base, simultaneamente, já que liberam prótons da carboxila e recebem prótons na amina, apresentando desta maneira um caráter anfótero. Para estas moléculas, o equilíbrio entre os compostos de ionização são geralmente descritos de forma semelhante à Reação 1. Após a dissolução dos sólidos em água, os grupos amino e carboxila da molécula são ionizados e quase completamente convertidos na forma zwitteriônica, de acordo com a Reação 2. Assim, quando o ácido é adicionado na solução aquosa contendo estas moléculas, a Reação 3 ocorre no sentido da direita para a esquerda. Neste caso, o zwitterion aceita um próton para formar um cátion devido à inibição da ionização do seu grupo carboxil. Na presença de uma base, o zwitterion doa um próton para o meio formando um ânion e impedindo então a ionização do grupo amino, conforme mostrado na Reação 4 (TSENG *et al.*, 2009).



As constantes de dissociação das reações 2, 3 e 4 são definidas de acordo com as Equações 2.1, 2.2 e 2.3, respectivamente.

$$K_a = \frac{a_{\text{NH}_3^+\text{RCOO}^-}}{a_{\text{NH}_2\text{RCOOH}}} \quad (2.1)$$

$$K_{a1} = \frac{a_{\text{NH}_3^+\text{RCOO}^-} \cdot a_{\text{H}^+}}{a_{\text{NH}_3^+\text{RCOOH}}} \quad (2.2)$$

$$K_{a2} = \frac{a_{\text{NH}_2\text{RCOO}^-} \cdot a_{\text{H}^+}}{a_{\text{NH}_3^+\text{RCOO}^-}} \quad (2.3)$$

onde o símbolo  $a_i$  corresponde à atividade da espécie  $i$ , sendo relacionada com a concentração da respectiva espécie através da Equação 2.4,

$$a_i = [i] \cdot \gamma_i \quad (2.4)$$

em que  $[i]$  é a concentração da espécie  $i$  e  $\gamma_i$ , o coeficiente de atividade da mesma espécie. Muitos casos de interesse nos processos bioquímicos envolvem soluções que são na maioria constituídas de água ou muito diluídas. Nestes casos, pode-se desconsiderar a não-idealidade

da solução e substituir as atividades pelas concentrações em termos de molalidades (SANDLER, 2006).

Uma vez que os valores das constantes de equilíbrio são geralmente pequenos, é comum utilizar a notação exibida na Equação 2.5. Essa equação significa que quanto maior a tendência para dissociar um próton, mais forte é o ácido e menor é o seu  $pK_a$ .

$$pK_{ai} = -\log(K_{ai}) \quad (2.5)$$

Os valores de  $pK_a$  e do  $pI$  são características intrínsecas de cada substância, e determinam o grau de ionização dos grupos funcionais de uma substância em uma escala de pH. Como consequência, muitas das propriedades química e bioquímicas destas moléculas variam com o grau de ionização e pH do meio. Por isso, é imprescindível o conhecimento das propriedades ácido-base de biomoléculas.

A determinação do valor do  $pK_a$  requer que a substância seja submetida a mudanças de pH, acompanhada da medida de uma propriedade específica que varie com o estado de ionização da molécula. Há vários métodos disponíveis para se determinar o valor do  $pK_a$  incluindo técnicas como a potenciometria, condutividade, calorimetria, espectroscopia no UV-visível e RMN, espectroscopia de massa, cromatografia líquida, eletroforese capilar, e as previsões a partir de software computacionais (DEMIRALAY *et al.*, 2012; MRESTANI *et al.*, 1998; PEREIRA *et al.*, 2011; QIANG e ADAMS, 2004).

A eletroforese capilar requer somente pequenas quantidades da amostra com baixa concentração do soluto, dispensando a medida de sua concentração e pureza, bem como a concentração do titulante. Mrestani *et al.* (1998) determinaram as constantes de dissociação de nove cefalosporinas a partir de uma nova técnica de eletroforese capilar e utilizaram a titulação potenciométrica como método comparativo, indicando a confiabilidade de ambos os métodos. Cantu *et al.* (2005), Ehala *et al.* (2010) e Shalaeva *et al.* (2008) também utilizaram a eletroforese para determinar valores de  $pK_a$  de componentes orgânicos.

De acordo com Demiralay *et al.* (2012), o método de espectrofotometria no UV-visível depende das espécies não carregadas e iônicas terem espectros diferentes. A cromatografia líquida também é utilizada uma vez que a retenção cromatográfica de compostos ionizáveis depende fortemente do  $pK_a$  do composto e pH da fase móvel. Estes autores determinaram experimentalmente as constantes de dissociação de sete antibióticos  $\beta$ -lactâmicos em água e mistura acetonitrila + água utilizando espectrofotometria e cromatografia líquida. As constantes de dissociação destes compostos também foram calculadas pelos programas NLREG e STAR, e por extrapolação. Finalmente, a aplicação de

diferentes técnicas foram comparadas, apresentando boa concordância entre os valores de  $pK_a$  obtidos.

Meloun *et al.* (2007) e Meloun *et al.* (2011) também utilizaram a espectrofotometria para determinar valores de  $pK_a$  de medicamentos. Este último combinou a técnica à potenciometria.

A titulação potenciométrica é particularmente a técnica mais econômica em tempo para a determinação de  $pK_a$  em solução aquosa; e quando tomado o devido cuidado, ela oferece boa precisão e reprodutibilidade, segundo Qiang e Adams (2004). Eles obtiveram experimentalmente a constante de dissociação de 26 antibióticos comuns na medicina humana e veterinária por esse método. Alekseev *et al.* (2005), Takács-Novák *et al.* (1997) e Zaworotko *et al.* (2006) também aplicaram o método para a obtenção de penicilinas e aminoácidos em diferentes temperaturas e concentrações de solventes.

Diversos autores relataram dados de  $pK_a$  da amoxicilina, ampicilina e seus subprodutos da síntese enzimática (ALEKSEEV *et al.*, 2005; BEZERRA *et al.*, 2013; CREA *et al.*, 2012; DEMIRALAY *et al.*, 2012; DIENDER *et al.*, 1998; KUROCHKINA e NYS, 2003; ORABI, 2005; RUDOLPH *et al.*, 1999; SANTANA *et al.*, 2010). Com exceção de Diender *et al.* (1998) e Rudolph *et al.* (1999); todos os demais determinaram as constantes de dissociação dos compostos a partir da titulação potenciométrica. Porém, os resultados são limitados a meio aquoso, e poucas opções de temperatura.

## 2.6 Modelagem termodinâmica

Compreender o comportamento termodinâmico de biomoléculas em soluções, incluindo dados termofísicos, solubilidade e  $pK_a$ , é de grande relevância em processos industriais de síntese e purificação. Isso requer a disponibilidade de uma enorme quantidade de dados experimentais. A fim de diminuir este esforço experimental e simplificar o desenvolvimento de processos de cristalização, a predição da solubilidade dessas moléculas como função de parâmetros como pH, tipo de sal, concentração de sal e temperatura, por um modelo termodinâmico é essencial (HERHUT *et al.*, 2016). A representação bem sucedida da solubilidade está diretamente relacionada com a capacidade de correlacionar e prever os coeficientes de atividade da biomolécula em solução.

Vários estudos, conforme exemplificado nas subseções seguintes, vêm sendo realizados para correlacionar os coeficientes de atividade de moléculas com características aminoácidas em meio aquoso como função da temperatura, pH, composição de solventes e

presença de eletrólitos. Dentre as duas principais abordagens para a descrição das propriedades termodinâmicas têm-se as equações de estado e os modelos de  $G^E$ . Enquanto as equações de estado podem ser usadas para se obter diferentes propriedades, tais como densidade, pressão de vapor, entalpia, etc., os modelos de  $G^E$  são adequados apenas para calcular solubilidades.

### 2.6.1 Equações de estado

Equações de estados correspondem a modelos matemáticos capazes de descrever o estado termodinâmico e representar as propriedades de estado. A equação de van der Waals foi a primeira entre elas; a partir de então, muitas modificações já foram desenvolvidas. Dentre as alterações mais comuns têm-se as regras de mistura para o termo atrativo e o desenvolvimento de novos termos repulsivos, resultando em modelos cada vez mais complexos do ponto de vista matemático. No entanto, estas equações não apresentam caráter preditivo para sistemas constituídos por moléculas complexas como aminoácidos e proteínas, que envolvem inúmeras interações em solução.

Para isso, métodos baseados na teoria de perturbação e mecânica estatística para calcular o coeficiente de atividade de aminoácidos em solução aquosa ganharam espaço. Dentre as equações que consideram as moléculas como cadeias longas tem-se a PHCT (*Perturbed Hard Chain Theory*), SPHCT (*Simplified Perturbed Hard Chain Theory*) e PACT (*Perturbed Anisotropic Chain Theory*).

Chapman *et al.* (1990) propuseram um modelo desenvolvido a partir da teoria de perturbação termodinâmica de Wertheim (1984a e b, 1986a e b) para fluidos com associação que recebeu o nome de SAFT (*Statistical Associating Fluid Theory*). A partir da publicação da teoria SAFT, muitos outros modelos foram desenvolvidos a partir da modificação dos termos da equação de estado. Utilizando a teoria de perturbação desenvolvida por Barker e Henderson (1967), Gross e Sadowski propuseram em 2001 o modelo PC-SAFT (*Perturbed Chain – Statistical Associating Theory*).

### 2.6.2 Modelos de $G^E$

Propriedade de excesso é a diferença entre a propriedade da mistura real e a mesma propriedade para uma solução ideal, nas mesmas condições de temperatura, pressão e

composição. Para o cálculo de equilíbrio de fases na fase líquida, geralmente modelos de  $G^E$  são utilizados para estimar a fugacidade das espécies envolvidas a partir da Equação 2.1.

$$\overline{G}_i^E = RT \ln \gamma_i \quad (2.1)$$

onde  $\overline{G}_i^E$  é a energia livre de Gibbs parcial molar de excesso do componente i, R é a constante universal dos gases, T a temperatura e  $\gamma_i$  corresponde ao coeficiente de atividade.

As primeiras tentativas de correlacionar dados experimentais de  $G^E$  consistiram nos modelos de Margules. No entanto, por considerar que a mistura é randômica, isto é, sem interações preferenciais entre as moléculas, estes modelos tem seu uso restrito a misturas compostas por elementos semelhantes quanto ao tamanho, estrutura e natureza química.

Visando melhorar a predição da fase líquida, outros modelos foram desenvolvidos com base no conceito de composição local. Segundo este conceito, são gerados, em nível microscópico, flutuações na composição local da mistura diferente da composição global da mistura. Essa diferença na composição local é responsável pelas orientações moleculares de curto alcance e não aleatórias que resultam de diferenças no tamanho molecular e das forças intermoleculares (XU *et al.*, 2004). Dentre os modelos que utilizam esse conceito pode-se citar as equações de Wilson, o NRTL (*Non-Random-Two-Liquid*) e o UNIQUAC (*Universal Quase-Chemical*).

Partindo do UNIQUAC, foi desenvolvido ainda outro método baseado na contribuição de grupos, o UNIFAC (*UNIQUAC Functional-group Activity Coefficients*). Neste modelo cada molécula é considerada como sendo uma mistura de grupos cujas forças intermoleculares são características destes grupos e independem da natureza do resto da molécula. Assim, uma mistura não consiste de moléculas, mas de grupos funcionais. Desta maneira, as propriedades de uma mistura podem ser representadas pela soma das contribuições individuais de cada um dos grupos que compõem a mesma (AGUIAR, 2009).

### 2.6.3 Modelos aplicados a sistemas contendo moléculas com características aminoácidas

As correlações de coeficientes de atividade e solubilidade de aminoácidos foram o foco de muitos estudos.

Chen *et al.* (1989), combinaram o modelo de NRTL com a formulação de Pitzer-Debye-Huckel para calcular o coeficiente de atividade de aminoácidos e peptídeos em soluções eletrolíticas.

Gupta e Heidemann (1990) utilizaram o modelo UNIFAC modificado para calcular o coeficiente de atividade de aminoácidos em água e usaram os mesmos parâmetros do grupo de prever as solubilidades de antibióticos na água. Já Pinho *et al.* (1994) introduziram termos de ionização das espécies do tipo Debye-Huckel no modelo UNIFAC para relatar o coeficiente de atividade de diferentes espécies iônicas resultando a ionização das moléculas de aminoácidos.

Gude *et al.* (1996) correlacionaram dados experimentais de solubilidade de sete aminoácidos em água + 1-butanol através da solubilidade de excesso aplicada no modelo de Margules.

Coutinho e Pessoa (2004) propuseram uma modificação do modelo UNIQUAC estendido para a descrição da não idealidade de soluções de proteína. Neste modelo, a contribuição combinatória Staverman-Guggenheim utilizada no modelo UNIQUAC estendida foi substituída por um termo Flory-Huggins.

O trabalho teórico de Ferreira *et al.* (2004) focou na aplicação da abordagem de solubilidade de excesso com modelos termodinâmicos convencionais, como o modelo de Margules, Equações de Wilson e NRTL. Apesar destes modelos convencionais não considerarem com precisão os efeitos da hidrofobicidade, o modelo NRTL permitiu uma boa representação.

Pazuki e Nikookar (2006) aplicaram os modelos NRTL, NRTL modificado e Wilson modificado para prever o coeficiente de atividades de aminoácidos e peptídeos simples em água, obtendo bons resultados quando comparados a dados experimentais disponíveis na literatura. Vários autores também usaram o modelo de Wilson modificado, obtendo resultados em concordância com dados disponíveis na literatura (PAZUKI *et al.*, 2007; SADEGHI, 2007; XU *et al.*, 2004).

Para representar o equilíbrio sólido-líquido de sistemas aquosos de aminoácidos e álcoois, Ferreira *et al.* (2008) combinaram a abordagem da solubilidade de excesso com as equações NRTL, NRTL modificado, UNIQUAC e também com o modelo apresentado por Gude *et al.* (1996), obtendo o desvio médio máximo e mínimo de 38,4% e 9,1% respectivamente, para L-treonina em mistura água/etanol utilizando a última combinação.

Tseng *et al.* (2009) usaram o modelo NRTL para prever as não-idealidades nas soluções de cinco aminoácidos em água pura a 25 °C, concordando os resultados obtidos com dados da literatura. Mota *et al.* (2009) aplicaram o modelo NRTL-SAC com sucesso para estimar solubilidades de fármacos. Os dados de solubilidade em solventes orgânicos puros foram usados para ajustar os parâmetros do modelo de soluto, que foram utilizados em seguida para a predição da solubilidade desses compostos em água e em sistemas com mais de

um solvente. Este modelo mostrou-se uma ferramenta adequada para representar e prever a solubilidade destas moléculas.

Khoshkbarch e Vera (1996), Liu *et al.* (1998) e Pazuki *et al.* (2006) adotaram a teoria da perturbação para a predição de coeficientes de atividade de sistemas aquosos contendo aminoácidos e peptídeos.

Rudolph *et al.* (1999) aplicaram o modelo de Khoshkbarchi e Vera (1996) para descrever a solubilidade de ampicilina e amoxicilina e seus precursores (PG, HPG e 6-APA) em água pura, como função de temperatura e pH. Nos sistemas de solvente misto (água + butanol) as solubilidades foram descritas razoavelmente com o modelo de  $G^E$  proposto por Gude *et al.* (1996).

Rudolph *et al.* (2001) verificaram que um modelo termodinâmico simples tal como o modelo de Gude *et al.* (1996) ou a sua versão modificada com apenas um parâmetro ajustável pode descrever o comportamento de fases da ampicilina, amoxicilina e seus precursores em água + 1-butanol razoavelmente bem.

Santana *et al.* (2010) também aplicaram o modelo de Khoshkbarch e Vera (1996) para a ampicilina e seus precursores, descrevendo qualitativamente a solubilidade em água para a ampicilina e HPG, porém não sendo capaz de descrever para 6-APA.

Ji *et al.* (2009) e Seyfi *et al.* (2009) aplicaram a equação SAFT para correlacionar solubilidade de aminoácidos em soluções aquosa e eletrolíticas, respectivamente, à 25 °C.

Fuchs *et al.* (2006) usaram a equação de estado PC-SAFT para calcular a solubilidade de aminoácidos em solução aquosa em função do pH, obtendo boa concordância com os dados experimentais. Cameretti e Sadowski (2008), Daldrup *et al.* (2010), Ferreira *et al.* (2008), Held *et al.* (2011), Held *et al.* (2014) e Ruether e Sadowski (2009) também obtiveram bons resultados a partir desde modelo para sistemas contendo aminoácidos e fármacos em diferentes temperaturas e composição de solventes. Kleiner *et al.* (2009) mostraram a aplicabilidade deste modelo na descrição da solubilidade do paracetamol em diferentes solventes e misturas de solventes.

Franco e Pessoa (2011) apresentaram uma expressão analítica da curva de solubilidade, como uma função das constantes de ionização, o pH e a solubilidade no composto no ponto isoelétrico, sendo aplicada com sucesso na descrição da solubilidade de insulina suína em função do pH em três diferentes temperaturas e de  $\beta$ -lactoglobulina bovina em quatro diferentes forças iônicas.

Franco *et al.* (2013) modificaram o modelo proposto por Franco e Pessoa (2011) de modo a aplicá-lo em sistemas contendo aminoácidos e moléculas com grupos  $\beta$ -lactâmicos

incluindo, para tanto, um termo de não-idealidade calculado pelo modelo de Pitzer para soluções eletrolíticas, obtendo sucesso na correlação dos dados experimentais de diversos aminoácidos, bem como da ampicilina e 6-APA. Bezerra *et al.* (2013) obtiveram boas correlações com este modelo quando aplicados em sistemas contendo amoxicilina e hidroxifenilglicina.

## CAPÍTULO 3 – DESCRIÇÃO DOS MATERIAIS UTILIZADOS

### 3.1 Reagentes

Para a realização deste trabalho foram utilizadas diversas substâncias químicas, conforme listadas na Tabela 3.1 com os seus respectivos graus de pureza e fabricante.

**Tabela 3.1 – Fabricante e pureza dos compostos usados**

Reagente	Fabricante	Pureza / % mássica
Amoxicilina cristalina	Sigma-Aldrich	–
Ampicilina	Sigma-Aldrich	–
D-(-)p-Hidroxifenilglicina	Sigma-Aldrich	99,0
D-(-)- $\alpha$ -Fenilglicina	Sigma-Aldrich	99,0
Hidróxido de sódio (NaOH)	Neon	P.A.
Ácido clorídrico (HCl)	Vetec	P.A.
Etanol	Merck	99,9
Biftalato de potássico (KHPH)	Nuclear	99,0
Solução aquosa padrão pH = 4,00 $\pm$ 0,01	SpecSol	–
Solução aquosa padrão pH = 7,00 $\pm$ 0,02	SpecSol	–
Solução aquosa padrão pH = 9,18 $\pm$ 0,02	SpecSol	–

Fonte: Autor.

A pureza da amoxicilina e ampicilina cristalinas foi determinada experimentalmente a partir de um analisador de Carbono Orgânico Total (TOC) estimado em 94% e 90%, respectivamente. Todos os reagentes foram utilizados sem purificação adicional. Em todos os experimentos foi utilizada água deionizada milliQ.

### 3.2 Equipamentos

Todos os equipamentos utilizados nos experimentos de solubilidade e titulação potenciométrica pertencem ao Núcleo de Pesquisa e Ensino em Petróleo e Gás (NUPEG), na Universidade Federal do Rio Grande do Noite (UFRN), e encontram-se listados a seguir:

- Balança analítica de precisão 0,0001g da marca Shimadzu, modelo AUW220D;

- Agitador magnético da marca Fisatom, modelo 751;
- Banho termostatizado com  $\pm 0,1^\circ\text{C}$  de precisão da marca Tecnal, modelo TE-184;
- pHmetro da marca Metrohm, modelo 827 pH-lab, com eletrodo modelo primatrode que apresenta  $\pm 0,003$  de precisão de pH combinado com um sensor de temperatura NTC com  $\pm 0,6^\circ\text{C}$  de precisão;
- Célula de equilíbrio de fases de vidro com volume interno de 40 mL;
- Titulador automático da marca Metrohm, modelo Dosimat 776.
- Analisador de Carbono Orgânico Total (TOC) da marca Shimadzu, modelo COT-V<sub>CPH</sub> utilizando gás oxigênio ultra-puro;
- Espectrofotômetro de UV-visível da marca Varian, modelo Cary 50.

Antes de cada ensaio foi realizado o procedimento de calibração do eletrodo de pH com as soluções aquosas padrão (4,00; 7,00 e 9,18). Para a medida precisa do pH nos sistemas contendo diferentes concentrações de etanol, além da calibração anterior foi realizada a calibração com solução de KHPH de acordo com as recomendação da IUPAC. O procedimento encontra-se descrito no Apêndice B.

A caracterização da ampicilina a partir da análise térmica (DSC e TG), espectrofotometria na região do infravermelho (FTIR) e microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi realizada no Núcleo de Processamento Primário e Reúso de Água Produzida e Resíduo (NUPPRAR), na Central Analítica do Instituto de Química, e no Laboratório de Caracterização Estrutural de Materiais pertencente ao Departamento de Engenharia de Materiais (DEMat), respectivamente, todos pertencentes à UFRN. A descrição dos equipamentos utilizados encontra-se a seguir:

- Sistema de análise termogravimétrico da marca TA Instruments, modelo SDT-Q600;
- Espectrômetro de infravermelho por transformada de Fourier da marca Shimadzu, modelo: IRAffinity – 1.
- Microscópio eletrônico de varredura da marca Hitachi, modelo Tabletop Microscope TM-3000; com um Detector EDS modelo SwiftED3000 da marca Oxford Instruments

Na análise térmica a amostra com massa em torno de 5,7 mg foi submetida a aquecimento partindo da temperatura ambiente até  $400^\circ\text{C}$ , com uma razão de aquecimento de  $5^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ , sob atmosfera dinâmica de nitrogênio com fluxo de  $100,0\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ .

## CAPÍTULO 4 - EQUILÍBRIO QUÍMICO DE BIOMOLÉCULAS

### 4.1 Introdução

Segundo Hilal *et al.* (1999), muitas moléculas de grande importância química e bioquímica contêm mais de um sítio ácido ou básico e algumas macromoléculas tais como peptídeos, proteínas e antibióticos podem conter centenas de tais grupos, capazes de sofrer reações ácido-base. Assim, essas moléculas quando em solução sofrem dissociação, podendo existir em um grande número de estados de ionização distintos, conforme a acidez da solução que se encontram. Esse processo de dissociação é considerado uma reação química reversível de dinâmica extremamente rápida. Neste contexto, temos que uma espécie química sempre vai existir em equilíbrio com outras formas de si mesma durante o processo de dissociação (Pádua, 2008).

A constante de dissociação ( $pK_a$ ) é um parâmetro importante para prever o estado de ionização da molécula em relação ao pH. Uma vez que a maioria dos fármacos têm funcionalidades ácidas e básicas, o seu estado de ionização é controlado por ambos o pH da solução e os valores de  $pK_a$  (DEMIRALAY *et al.*, 2012; QIANG e ADAMS, 2004), podendo a molécula encontrar-se na forma catiônica, zwitteriônica e aniônica numa determinada condição. Estas espécies químicas têm propriedades muito diferentes no que diz respeito à solubilidade em água, a volatilidade, e a reatividade com oxidantes químicos. Em alguns casos, diferem até na absorção em UV (QIANG e ADAMS, 2004).

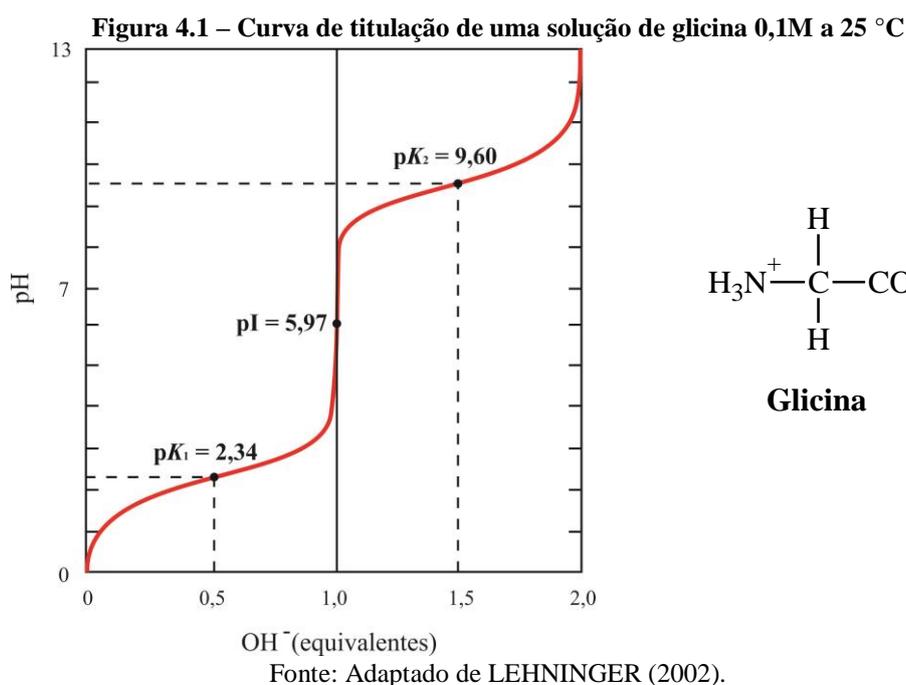
Os valores de  $pK_a$  de muitos antibióticos não são conhecidos com precisão ou não estão disponíveis em uma maior variedade de condições. Baseado nisso, este capítulo abordará os conceitos que regem o equilíbrio químico das reações ácido-base proveniente da dissociação das biomoléculas, aplicando os conhecimentos expostos na determinação das constantes de dissociação da amoxicilina, ampicilina, hidroxifenilglicina e fenilglicina variando a temperatura de 10 a 25 °C, em misturas de água+etanol nas concentrações de 0 até 70% (m/m) de etanol.

### 4.2 Curva potenciométrica de biomoléculas

Compostos bifuncionais acídicos, assim como aminoácidos, proteínas e antibióticos, possuem curvas de titulação características que revelam os valores de  $pK_a$ , sendo essa técnica

muito utilizada na literatura para a determinação experimental destas constantes (FERNÁNDEZ-LAFUENTE *et al.*, 1991; FERNÁNDEZ-LAFUENTE *et al.*, 1996; KIM e LEE, 1996; SANTANA, 2007; VIEIRA, 2003).

A titulação constitui na adição ou remoção gradual de prótons. A Figura 4.1 mostra a curva de titulação da forma diprótica da glicina, em que cada molécula de base adicionada resulta na remoção de um próton de uma molécula de aminoácido. Assim, a curva apresenta dois estágios distintos, cada um deles correspondendo à remoção de um próton de um dos grupos ionizáveis do aminoácido.



Em pH muito baixo, a espécie iônica predominante da glicina é  $^+\text{H}_3\text{N}-\text{CH}_2-\text{COOH}$ , na sua forma totalmente protonada. À medida que a titulação inicia, no primeiro estágio o grupo carboxila, por apresentar um caráter mais ácido que o grupo amino, começa a perder seu próton até atingir o ponto de inflexão em pH igual a 5,97. Neste ponto de inflexão a remoção do primeiro próton da glicina está essencialmente completa, estando a mesma presente principalmente como um íon dipolar (zwitteriônico)  $^+\text{H}_3\text{N}-\text{CH}_2-\text{COO}^-$ , configurando assim o chamado ponto isoelétrico da glicina. A partir de então se inicia o segundo estágio da titulação correspondente à remoção de um próton do grupo amino da molécula, predominando no final deste estágio a forma  $\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{COO}^-$ , totalmente desprotonada.

Geralmente, cada estágio da titulação é representado por uma reação de desprotonação fornecendo uma constante de equilíbrio conforme a Equação 4.1.

$$K_a = \frac{[H^+][A^-]}{[HA]} \quad (4.1)$$

Isolando a concentração de íons de hidrogênio da equação acima e aplicando o logaritmo, obtém-se a Equação 4.2 conhecida como Equação de Henderson-Hasselbalch.

$$pH = pK_a + \log \frac{[A^-]}{[HA]} \quad (4.2)$$

De forma geral,

$$pH = pK_a + \log \frac{[\text{receptor de prótons}]}{[\text{doador de prótons}]} \quad (4.3)$$

No ponto médio de qualquer estágio da titulação, estão presentes concentrações equimolares da forma doadora de prótons e da forma receptora de prótons. Neste caso, o pH é igual ao  $pK_a$  do grupo protonado que está sendo titulado, conforme a Equação 4.3. Para a glicina, o pH no ponto médio do primeiro estágio é de 2,34. Logo, o grupo carboxila tem um  $pK_a$  de 2,34, enquanto o grupo amino apresenta  $pK_a$  igual a 9,60, em virtude do ponto médio do segundo estágio ser neste valor de pH.

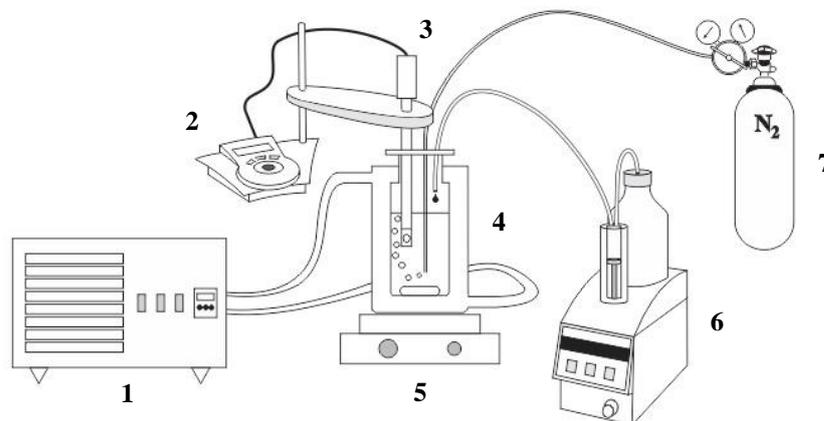
Segundo Lehninger (2002), todas as moléculas com características aminoácidas contendo um único grupo  $\alpha$ -amino, um único grupo  $\alpha$ -carboxila e um grupo R não ionizável têm curvas de titulação que se assemelham à da glicina. Esses compostos são caracterizados por apresentar valores de  $pK_a$  muito similares, embora não idênticos.

### 4.3 Metodologia experimental

#### 4.3.1 Obtenção das curvas potenciométricas

As curvas potenciométricas da AMOX, AMP, HPG e PG foram obtidas com o objetivo de determinar as constantes de ionização dos respectivos componentes. A configuração experimental utilizada para tal finalidade encontra-se ilustrada na Figura 4.2.

**Figura 4.2 – Esquema do aparato experimental utilizado para a obtenção das curvas potenciométricas: (1)banho termostático, (2) pHmetro com indicação de temperatura, (3) eletrodo de pH com sensor de temperatura, (4) célula de equilíbrio enjaquetada (5) agitador magnético, (6) titulador automático, (7) cilindro de gás nitrogênio**



Fonte: Autor.

Inicialmente, foram preparadas soluções estoque de cada componente em todas as composições da mistura de solventes. Em seguida, adicionou-se 15 mL desta solução estoque na célula de equilíbrio sob constante agitação magnética e acidificou-se com solução HCl 0,1 molal até cerca de pH 2,5. A temperatura foi ajustada no valor de interesse com o sensor de temperatura acoplado ao pHmetro e controlada por um banho termostático. Depois de estabilizada a temperatura da solução, o sistema foi submetido à titulação com solução de NaOH gota a gota por meio do titulador, com o pH sendo medido a cada adição (0,01 mL). As concentrações de solução estoque e titulante variaram entre os componentes e composições de etanol na mistura de solventes, conforme apresentado na Tabela 4.1.

**Tabela 4.1 – Concentração das soluções estoque e de NaOH utilizadas para a obtenção das curvas potenciométricas**

Componente	$w_2$ (% m/m)	$C_{\text{ESTOQUE}}$ (mmolal)	$C_{\text{TITULANTE}}$ (mmolal)
AMOX	0, 10, 30, 50 e 70	2,0	0,5
AMP	0, 10, 30, 50 e 70	2,0	0,5
HPG	0 e 10	50,0	6,0
	30	20,0	3,0
PG	50 e 70	5,0	1,0
	0, 10, 30, 50, 70	5,0	1,0

$w_2$  = fração mássica de etanol em água livre de soluto.

Fonte: Autor.

Durante a titulação, utilizou-se borbulhamento de nitrogênio para eliminar possível quantidade de dióxido de carbono dissolvido na solução. Além disso, as soluções de NaOH foram feitas na hora da titulação, como forma alternativa de eliminar possível presença de CO<sub>2</sub> no meio. Todos os ensaios foram realizados em quadruplicata.

#### 4.3.2 Determinação experimental das constantes de ionização

A titulação potenciométrica é a técnica mais tradicional para se determinar valores de pK<sub>a</sub>. Nessa técnica, durante a titulação da solução, o pH é monitorado com um eletrodo e o pK<sub>a</sub> é calculado a partir das mudanças na forma da curva V<sub>NaOH</sub> versus pH (PEREIRA *et al.*, 2011).

Qiang e Adams (2004) citaram três métodos numéricos possíveis para determinar os valores de pK<sub>a</sub> a partir de curvas potenciométricas, a saber: o gráfico de Gran, a segunda derivada e a regressão não linear dos mínimos quadrados. Neste trabalho, optou-se pelo uso do segundo método.

No método da segunda derivada o ponto final de titulação de um estágio é representado pelo ponto de inflexão da curva potenciométrica, em que consiste na parte da curva onde se observa a inclinação mais acentuada, ou seja, onde a alteração de pH resultante da adição de NaOH é máxima. Logo, tem-se que a primeira derivada (dpH/dV) apresenta seu valor máximo, enquanto que a segunda derivada (d<sub>2</sub>pH/dV<sup>2</sup>) é nula.

Para a determinação dos valores de pK<sub>a</sub> da AMOX, AMP, HPG e PG utilizou-se uma ferramenta computacional (GUTZ, 2015) que determina de maneira automática as inflexões da curva potenciométrica, bem como a primeira e segunda derivada, a partir da interpolação com alisamento dos dados experimentais por *splines* cúbicos. Este procedimento foi realizado de maneira cuidadosa, procurando identificar possíveis erros nas derivadas oriundos da interpolação. O primeiro ponto de inflexão representa o ponto final do primeiro estágio de titulação, em que todos os grupos carboxila encontram-se desprotonados. Nesta região as moléculas encontram-se predominantemente na sua forma zwitteriônica, e o pH registrado neste ponto corresponde ao ponto isoelétrico do composto. O segundo ponto de inflexão representa o ponto final do segundo estágio de titulação, ou seja, onde foram retirados todos os prótons dos grupos amino.

Quando o volume de NaOH neutraliza a metade dos grupos amino, é válida a Equação 4.4:

$$\frac{[\text{NH}_2 \text{RCOO}^-]}{[\text{NH}_3^+ \text{RCOO}^-]} = 1 \quad (4.4)$$

e a Equação 3.2 torna-se  $\text{pH} = \text{p}K_a$ . Portanto, na metade do volume final do segundo estágio temos o  $\text{p}K_a$  do grupo amino. Sabendo disso, calculou-se o volume médio entre os dois pontos de inflexão da curva potenciométrica, sendo a segunda constante de ionização ( $\text{p}K_{a2}$ ) determinada pelo pH equivalente a esse volume médio na curva potenciométrica.

A AMOX apresenta em sua estrutura um grupo fenólico ionizável, correspondente a terceira constante de dissociação. Neste caso, a determinação de  $\text{p}K_{a3}$  seguiu o mesmo conceito de  $\text{p}K_{a2}$ , sendo determinada pelo pH equivalente ao volume médio entre o segundo e o terceiro pontos de inflexão. Como os compostos apresentados neste trabalho apresentam quantidades iguais dos grupos ionizáveis, é esperado que o volume necessário para a desprotonação de cada um dos grupos seja igual. Portanto, é razoável considerar que o volume de NaOH que neutraliza os grupos amino seja igual ao volume de NaOH que foi necessário para ionizar os grupos fenólicos, de tal forma que os pontos de inflexão sejam equidistantes.

A primeira constante de ionização ( $\text{p}K_{a1}$ ) é calculada por diferença a partir da definição do ponto isoelétrico para essas moléculas, como descrito pela Equação 4.5.

$$\text{pI} = \frac{\text{p}K_{a1} + \text{p}K_{a2}}{2} \quad (4.5)$$

Considerando que para cada conjunto de variáveis (composto, temperatura e composição de etanol) foram obtidas quatro curvas potenciométricas, os resultados finais foram estimados a partir da média entre os três valores mais próximos entre si. O desvio padrão das medidas  $u(x)$  foi definido pela seguinte expressão:

$$u(x) = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{N-1}} \quad (4.6)$$

onde  $x_i$  é o resultado experimental da amostra  $i$  e  $\bar{x}$  é a média aritmética de  $N$  resultados experimentais.

#### 4.4 Resultados e discussão

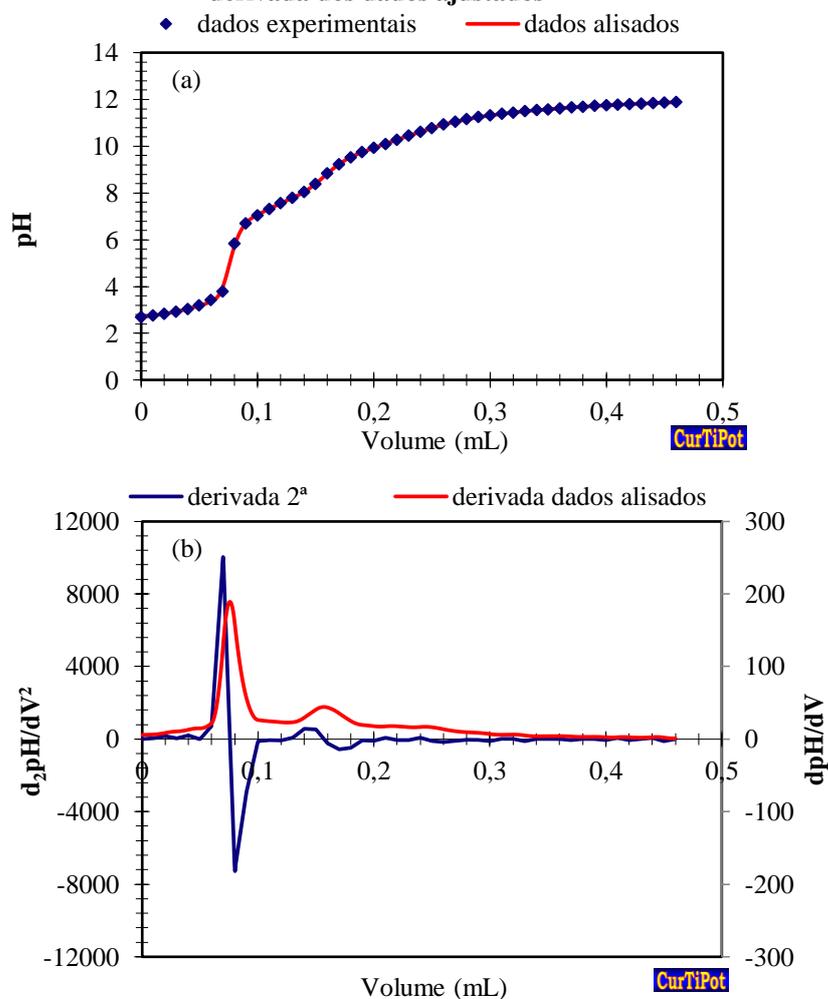
Todos os compostos apresentados neste trabalho, com exceção da AMOX, correspondem a moléculas dipróticas, havendo dois grupos passíveis de ionização (ácido carboxílico e amino). Essas moléculas podem ser descritas como existindo em três formas possíveis,  $H_2A^+$  (forma catiônica),  $H^+A^-$  (forma zwitteriônica) e  $A^-$  (forma aniônica). A AMOX apresenta ainda um terceiro grupo ionizável representado pela estrutura fenólica, podendo encontrar-se em até quatro espécies ionizáveis diferentes. O processo de dissociação da AMOX e demais compostos pode ser descrito segundo as reações 4.1 e 4.2, respectivamente.



A presença de cargas elétricas na molécula é um dos fatores que mais influencia na solubilidade de compostos com características aminoácidas. Devido a isso, e sabendo que o estado de ionização de uma molécula é controlada pelos valores de  $pK_a$  do composto e pH do meio, é fundamental o conhecimento dos valores de  $pK_{a1}$ ,  $pK_{a2}$  e  $pK_{a3}$  bem como o pI dos compostos de interesse neste trabalho.

Na titulação potenciométrica da AMOX, AMP, HPG e PG devem ser obtidas curvas sigmoidais apresentando três ou dois pontos de inflexão, cada um correspondendo a um estágio de ionização das reações 4.1 ou 4.2, respectivamente. A Figura 4.3 mostra os gráficos gerados na análise de uma curva potenciométrica da AMOX obtida em água pura a 25 °C. Todas as curvas obtidas para os demais compostos e condições de temperatura e concentração de etanol apresentaram comportamento semelhante diferindo somente na ausência do terceiro ponto de inflexão, embora nas curvas da AMOX tenha se mostrado bastante discreto. Trabalhos reportam que isso ocorre em alguns ácidos polipróticos em consequência da fraca acidez do grupo ionizável.

Figura 4.3 – Análise da curva potenciométrica da amoxicilina em água pura à 25 °C através do método da segunda derivada: (a) Interpolação e ajuste dos dados experimentais, (b) Curvas de primeira e segunda derivada dos dados ajustados



Fonte: Autor

Em todos os ensaios, os ajustes dos dados experimentais apresentam um coeficiente de correlação ( $R^2$ ) maior que 0,999 e desvio padrão em pH menor que 0,05.

As constantes de dissociação obtidas estão apresentadas nas Tabelas 4.2 à 4.5. É importante destacar que os resultados de  $pK_{a1}$  apresentaram maior desvio ( $u$ ) em virtude deste ser obtido indiretamente, a partir dos dados de pI e  $pK_{a2}$ , gerando uma incerteza acumulada de ambos os dados.

**Tabela 4.2 – Constante de dissociação e ponto isoelétrico da amoxicilina em diferentes temperaturas e composição de etanol ( $w_2$ ), à pressão atmosférica  $p = 0,1013$  MPa**

$T/^\circ\text{C}$	$w_2$	$\text{p}K_{a1}$	$u(\text{p}K_{a1})$	$\text{pI}$	$u(\text{pI})$	$\text{p}K_{a2}$	$u(\text{p}K_{a2})$	$\text{p}K_{a3}$	$u(\text{p}K_{a3})$
25	0,00	2,68	0,17	5,02	0,08	7,47	0,01	9,84	0,05
	0,10	2,48	0,13	4,71	0,06	7,03	0,02	9,80	0,02
	0,30	3,01	0,14	5,01	0,04	7,07	0,06	10,49	0,06
	0,50	3,50	0,04	5,21	0,06	7,06	0,01	11,09	0,14
	0,70	4,22	0,14	5,74	0,08	7,25	0,05	11,73	0,12
20	0,00	2,63	0,13	5,08	0,04	7,62	0,04	9,97	0,02
	0,10	2,35	0,37	4,79	0,21	7,17	0,06	9,82	0,06
	0,30	2,99	0,20	5,08	0,08	7,19	0,05	10,56	0,17
	0,50	3,60	0,37	5,34	0,14	7,22	0,04	11,20	0,05
	0,70	4,16	0,20	5,80	0,11	7,39	0,03	11,83	0,01
15	0,00	2,58	0,20	5,17	0,10	7,75	0,01	10,02	0,05
	0,10	2,15	0,23	4,82	0,12	7,27	0,02	9,88	0,04
	0,30	2,95	0,04	5,15	0,03	7,32	0,01	10,67	0,05
	0,50	3,70	0,11	5,52	0,04	7,37	0,02	11,35	0,03
	0,70	4,15	0,19	5,85	0,10	7,53	0,04	11,92	0,12
10	0,00	2,52	0,24	5,26	0,12	7,91	0,06	10,10	0,11
	0,10	2,03	0,01	4,85	0,01	7,46	0,01	9,98	0,04
	0,30	2,83	0,30	5,23	0,09	7,46	0,05	10,81	0,03
	0,50	3,77	0,23	5,65	0,12	7,50	0,03	11,50	0,05
	0,70	4,13	0,15	5,89	0,06	7,65	0,03	12,06	0,07

$w_2$  = fração mássica de etanol em água livre de soluto;  $u$  = incerteza experimental definida pela Equação 4.6.

Fonte: Autor

**Tabela 4.3 – Constante de dissociação e ponto isoelétrico da ampicilina em diferentes temperaturas e composição de etanol ( $w_2$ ), à pressão atmosférica  $p = 0,1013$  MPa**

$T/^\circ\text{C}$	$w_2$	$\text{p}K_{a1}$	$u(\text{p}K_{a1})$	$\text{pI}$	$u(\text{pI})$	$\text{p}K_{a2}$	$u(\text{p}K_{a2})$
25	0,00	2,64	0,10	4,95	0,07	7,24	0,09
	0,10	2,52	0,07	4,46	0,16	6,79	0,04
	0,30	3,20	0,17	4,79	0,10	6,77	0,01
	0,50	3,68	0,01	5,18	0,01	6,70	0,01
	0,70	4,33	0,16	5,48	0,11	6,79	0,05
20	0,00	2,62	0,01	5,03	0,02	7,39	0,03
	0,10	2,43	0,17	4,60	0,06	6,93	0,04
	0,30	3,08	0,03	4,88	0,01	6,90	0,02
	0,50	3,67	0,18	5,23	0,09	6,91	0,01
	0,70	4,22	0,13	5,54	0,09	6,97	0,05
15	0,00	2,59	0,13	5,10	0,05	7,54	0,04
	0,10	2,36	0,23	4,74	0,18	7,10	0,02
	0,30	2,96	0,33	4,98	0,16	7,00	0,01
	0,50	3,66	0,01	5,31	0,01	7,05	0,01
	0,70	4,11	0,11	5,59	0,08	7,11	0,06
10	0,00	2,56	0,18	5,17	0,11	7,74	0,06
	0,10	2,27	0,10	4,86	0,06	7,26	0,01
	0,30	2,79	0,10	5,10	0,03	7,16	0,02
	0,50	3,63	0,13	5,38	0,09	7,18	0,14
	0,70	3,99	0,18	5,63	0,17	7,27	0,06

$w_2$  = fração mássica de etanol em água livre de soluto;  $u$  = incerteza experimental definida pela Equação 4.6.

Fonte: Autor

**Tabela 4.4 – Constante de dissociação e ponto isoelétrico da hidroxifenilglicina em diferentes temperaturas e composição de etanol ( $w_2$ ), à pressão atmosférica  $p = 0,1013$  MPa**

$T/^\circ\text{C}$	$w_2$	$\text{p}K_{a1}$	$u(\text{p}K_{a1})$	$\text{pI}$	$u(\text{pI})$	$\text{p}K_{a2}$	$u(\text{p}K_{a2})$
25	0,00	1,86	0,06	5,30	0,04	8,77	0,07
	0,10	1,52	0,20	5,04	0,11	8,46	0,04
	0,30	2,25	0,23	5,51	0,09	8,83	0,08
	0,50	2,75	0,11	5,86	0,06	9,10	0,03
	0,70	3,08	0,22	6,16	0,10	9,32	0,05
20	0,00	2,00	0,04	5,40	0,08	8,88	0,04
	0,10	1,69	0,26	5,15	0,13	8,55	0,07
	0,30	2,35	0,10	5,64	0,06	8,97	0,04
	0,50	2,77	0,01	5,97	0,11	9,21	0,01
	0,70	3,22	0,01	6,28	0,02	9,42	0,04
15	0,00	2,10	0,16	5,53	0,02	8,99	0,11
	0,10	1,85	0,25	5,26	0,17	8,66	0,09
	0,30	2,42	0,18	5,80	0,16	9,13	0,10
	0,50	2,86	0,07	6,13	0,03	9,36	0,01
	0,70	3,29	0,08	6,39	0,04	9,51	0,01
10	0,00	2,23	0,18	5,61	0,13	9,08	0,13
	0,10	2,07	0,27	5,42	0,14	8,74	0,04
	0,30	2,53	0,17	5,98	0,11	9,29	0,04
	0,50	2,91	0,13	6,25	0,09	9,50	0,06
	0,70	3,38	0,21	6,46	0,11	9,65	0,09

$w_2$  = fração mássica de etanol em água livre de soluto;  $u$  = incerteza experimental definida pela Equação 4.6

Fonte: Autor

**Tabela 4.5 – Constante de dissociação e ponto isoelétrico da fenilglicina em diferentes temperaturas e composição de etanol ( $w_2$ ), e pressão atmosférica  $p = 0,1013$  MPa**

$T/^\circ\text{C}$	$w_2$	$\text{p}K_{a1}$	$u(\text{p}K_{a1})$	$\text{pI}$	$u(\text{pI})$	$\text{p}K_{a2}$	$u(\text{p}K_{a2})$
25	0,00	1,80	0,12	5,57	0,06	9,10	0,09
	0,10	1,47	0,16	5,15	0,08	8,71	0,04
	0,30	2,20	0,26	5,51	0,04	8,94	0,01
	0,50	2,65	0,2	5,80	0,11	8,92	0,01
	0,70	3,11	0,24	6,18	0,16	9,08	0,05
20	0,00	1,86	0,06	5,65	0,05	9,25	0,03
	0,10	1,70	0,43	5,27	0,3	8,84	0,04
	0,30	2,28	0,08	5,60	0,03	9,06	0,02
	0,50	2,68	0,47	5,85	0,21	9,02	0,01
	0,70	3,17	0,25	6,18	0,15	9,20	0,05
15	0,00	1,92	0,1	5,75	0,05	9,45	0,04
	0,10	1,79	0,33	5,40	0,17	8,98	0,02
	0,30	2,32	0,03	5,66	0,01	9,16	0,01
	0,50	2,72	0,35	5,93	0,18	9,14	0,01
	0,70	3,20	0,26	6,22	0,18	9,35	0,06
10	0,00	1,97	0,42	5,81	0,21	9,60	0,06
	0,10	1,83	0,2	5,48	0,1	9,10	0,01
	0,30	2,39	0,07	5,79	0,02	9,26	0,02
	0,50	2,75	0,35	6,04	0,18	9,30	0,14
	0,70	3,23	0,31	6,26	0,17	9,51	0,06

$w_2$  = fração mássica de etanol em água livre de soluto;  $u$  = incerteza experimental definida pela Equação 4.6.

Fonte: Autor

O conhecimento dos valores de  $\text{p}K_a$  permite calcular da fração das espécies catiônica, zwitteriônica e aniônica em equilíbrio a um dado pH. Para simplificar, neste trabalho desconsiderou-se o coeficiente de atividade das espécies, em virtude das condições de baixa concentração apresentada pelos compostos estudados. Logo, a distribuição iônicas em função do pH é facilmente descrita pelas Equações 4.7 à 4.9, partindo da equação do balanço de massa,

$$\alpha^\pm = \frac{K_{a1}[\text{H}^+]}{[\text{H}^+]^2 + K_{a1}[\text{H}^+] + K_{a1}K_{a2}} \quad (4.7)$$

$$\alpha^+ = \frac{[\text{H}^+]^2}{[\text{H}^+]^2 + K_{a1}[\text{H}^+] + K_{a1}K_{a2}} \quad (4.8)$$

$$\alpha^- = \frac{K_{a1}K_{a2}}{[\text{H}^+]^2 + K_{a1}[\text{H}^+] + K_{a1}K_{a2}} \quad (4.9)$$

onde  $\alpha^\pm$ ,  $\alpha^+$  e  $\alpha^-$  são as frações de moléculas zwitteriônica, catiônica e aniônica na solução em equilíbrio, respectivamente,  $K_{a1}$  e  $K_{a2}$  correspondem as constantes de dissociação dos grupos carboxílico e amino; e  $[\text{H}^+]$  equivale a concentração dos íons hidrogênio em equilíbrio na solução. Segundo Kurochkina *et al.* (2011), no ponto isoelétrico a Equação 4.7 se transforma na seguinte expressão:

$$\alpha^\pm = \frac{1}{1 + 2\sqrt{K_{a2}/K_{a1}}} \quad (4.10)$$

A estimativa de  $\alpha^\pm$  para AMOX e AMP em água pura usando a Equação 4.10 mostrou que no ponto isoelétrico mais de 99% dos antibióticos encontram-se na forma zwitteriônica, enquanto que menos de 1% estão nas outras formas iônicas ( $\alpha^+ = \alpha^-$ ). Isso significa que em valores de pH maior ou menor que o pI, a quantidade da terceira forma iônica correspondente (aniônica ou catiônica) é menor que 0,5%. Todavia, o aumento da concentração de etanol provocou uma diminuição na diferença entre os valores de  $\text{p}K_{a1}$  e  $\text{p}K_{a2}$ . Isso ocasionou um aumento do termo  $K_{a2}/K_{a1}$ , diminuindo a fração de moléculas zwitteriônicas em equilíbrio para 94 e 89%, nos sistemas contendo 70% (m/m) de etanol para AMOX e AMP respectivamente. Como a diferença entre os valores de  $\text{p}K_{a1}$  e  $\text{p}K_{a2}$  em HPG e PG são maiores, o denominador da Equação 4.10 tende à unidade. Para estes compostos, em todas as condições de solvente estudadas o ponto isoelétrico apresentou mais de 99% das moléculas na sua forma zwitteriônica.

Durante a titulação, as concentrações de HCl and NaOH variaram de 0,005 à 0,02 molal e de 0,009 à 0,016 molal, respectivamente. Isso ocasionou uma variação na força iônica do meio, conforme os valores apresentados na Tabela 4.6. Embora o efeito da força iônica ( $I$ ) nas propriedades ácido-base de moléculas com características aminoácidas seja discutido frequentemente, uma simplificação razoável foi feita desconsiderando este efeito, devido às baixas variações apresentadas quando comparadas aos valores de  $I$  relatados na literatura (ALEKSEEV *et al.*, 2005; CREA *et al.*, 2012; QIANG e ADAMS, 2004; SU *et al.* 2007).

**Tabela 4.6 – Variação mínima e máxima do efeito iônico ocasionada nas titulações potenciométricas dos compostos estudados**

Composto	$w_2$	Mínimo	Máxima
AMOX	0, 10, 30, 50 e 70	0,004 – 0,016	0,022 – 0,041
AMP	0, 10, 30, 50 e 70	0,008 – 0,017	0,021 – 0,038
	0 e 10	0,035 – 0,159	0,037 – 0,170
HPG	30	0,032 – 0,088	0,032 – 0,093
	50 e 70	0,024 – 0,044	0,027 – 0,050
PG	0, 10, 30, 50 e 70	0,004 – 0,016	0,030 – 0,050

$w_2$  = fração mássica de etanol em água livre de soluto.

Fonte: Autor

#### 4.4.1 Efeito da temperatura

O efeito da temperatura sobre as constantes de dissociação dos compostos foi investigado no intervalo entre 10 e 25 °C. Em geral, para os sistemas estudados contendo AMOX e AMP os valores de  $pK_{a1}$  aumentaram com o aumento da temperatura. No entanto, os valores de  $pK_{a2}$  diminuíram. Essa tendência antagônica entre as constantes de dissociação significa que, quando diminuimos a temperatura do meio, o grupo carboxílico aumenta seu caráter ácido e o grupo amino torna-se mais básico, favorecendo a presença de moléculas zwitteriônicas. Este comportamento também foi relatado por Crea *et al.* (2012) e Zaworotko *et al.* (2006). Martell e Smith (1997) apud Crea *et al.* (2012) reportaram que para moléculas contendo grupos fenólicos, sua constante de dissociação deve variar inversamente com a temperatura. Este conceito está condizente com os resultados de  $pK_{a3}$  obtidos neste trabalho. Já os subprodutos destes antibióticos

O conhecimento dos valores de  $pK_a$  em diferentes temperaturas permitiram calcular os parâmetros termodinâmicos relacionados às reações de dissociação 4.1 e 4.2. Uma vez que estas informações são pouco relatadas na literatura, tais resultados são essenciais para melhor entendimento das propriedades ácido-base dos compostos em estudados. Partindo da aproximação de que as variações da entalpia padrão e entropia padrão das reações de dissociação são constantes no intervalo de temperatura estudado, tais propriedades foram calculadas a partir da correlação entre os dados experimentais usando a forma linear da equação de Van't Hoff apresentada na Equação 4.11:

$$\ln K_a = -\frac{\Delta H}{RT} + \frac{\Delta S}{R} \quad (4.11)$$

onde  $K_a$  é a constante de dissociação,  $\Delta H$  e  $\Delta S$  são as variações de entalpia padrão e entropia padrão da reação,  $R$  é a constante universal dos gases e  $T$ , a temperatura da reação. A energia livre de Gibbs ( $\Delta G$ ) foi calculada a partir da definição:

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (4.12)$$

Os valores de  $pK_a$  obtidos apresentaram uma relação linear com a temperatura, cujas correlações lineares variaram de 0,869 até 0,999. Os menores valores de  $R^2$  foram encontrados nas reações de dissociação do grupo carboxílico. Este resultado é esperado devido à maior incerteza das medidas confirmada pelo desvio padrão, como já mencionado anteriormente. Na Tabela 4.7 encontram-se os valores das propriedades termodinâmicas obtidas a partir destes gráficos.

**Tabela 4.7 – Variações da entalpia e entropia padrão das reações de dissociação dos grupos ionizáveis**

$w_2$	$\Delta H_1$ (kJ/mol)	$\Delta H_2$ (kJ/mol)	$\Delta H_3$ (kJ/mol)	$\Delta S_1$ (J/mol)	$\Delta S_2$ (J/mol)	$\Delta S_3$ (J/mol)	$\Delta G_1^a$ (kJ/mol)	$\Delta G_2^a$ (kJ/mol)	$\Delta G_3^a$ (kJ/mol)
<i>Amoxicilina</i>									
0	-17,14	46,87	26,77	-108,81	14,15	-98,97	15,30	42,65	56,28
0,1	-50,08	44,98	19,48	-215,48	16,35	-121,91	14,17	40,11	55,83
0,3	-9,05	42,03	34,66	-88,00	5,69	-84,26	17,19	40,19	55,22
0,5	29,37	47,47	44,64	31,37	23,88	-62,39	20,02	40,27	54,61
0,7	-9,00	43,28	34,95	-110,72	6,25	-107,24	10,79	40,35	54,00
<i>Ampicilina</i>									
0	-8,74	53,38		-79,89	40,57		15,08	41,28	
0,1	-26,50	51,08		-137,06	41,43		14,36	38,73	
0,3	-43,68	41,08		-207,92	8,18		18,31	38,64	
0,5	-5,19	50,97		-87,94	42,20		21,03	38,39	
0,7	-26,75	51,04		-175,51	40,99		25,58	38,82	
<i>Hidroxifenilglicina</i>									
0	39,09	33,59		95,35	-55,35		10,66	50,09	
0,1	58,78	30,08		168,22	-61,09		8,63	48,29	
0,3	29,42	50,08		55,55	-0,99		12,86	50,38	
0,5	18,24	43,43		8,75	-28,43		15,63	51,91	
0,7	31,36	35,13		45,85	-60,47		17,69	53,16	
<i>Fenilglicina</i>									
0	18,41	54,93		27,23	10,10		10,29	51,92	
0,1	37,60	41,00		96,92	-25,99		8,70	48,75	
0,3	19,70	34,23		23,83	-56,48		12,60	51,07	
0,5	10,99	40,78		-13,87	-33,73		15,13	50,84	
0,7	12,61	46,58		-17,42	-17,43		17,80	51,78	

<sup>a</sup> Calculado em  $T = 298,15$  K;  $w_2$  = fração mássica de etanol em água livre de soluto. Fonte: Autor.

Os valores negativos de  $\Delta H_1$  na maioria das composições de etanol mostram que a dissociação do grupo carboxílico presente na AMOX e AMP ocorre através de uma reação exotérmica, enquanto que as demais reações de dissociação absorvem calor. Avaliando a energia livre de Gibbs, todas as reações apresentaram valores positivos de  $\Delta G$ , indicando que os grupos  $-\text{NH}_3^+$ ,  $-\text{COOH}$  e  $-\text{OH}$  são mais estáveis e favorecidos termodinamicamente que  $-\text{NH}_2$ ,  $-\text{COO}^-$  e  $-\text{O}^-$ , análogo ao reportado por Orabi (2005) e Crea *et al.* (2012). As propriedades termodinâmicas calculadas se mostraram compatíveis com os valores apresentados por Crea *et al.* (2012).

#### 4.4.2 Efeito do solvente

Segundo Orabi (2005), o efeito do solvente sobre as propriedades ácido-base de moléculas anfóteras é geralmente interpretado pelo sinergismo entre mudanças eletrostáticas (variação da constante dielétrica do meio) e mudanças não eletrostáticas (mudança na basicidade do meio). Contudo, outros fatores, tais como a estabilização das diferentes espécies existentes em equilíbrio através de pontes de hidrogênio, juntamente com interações íon-solvente e forças de dispersão, desempenham um papel importante na ionização de ácidos fracos.

O aumento da concentração de etanol causou um aumento significativo nos valores de  $\text{p}K_a$ , especialmente do grupo carboxílico ( $\text{p}K_{a1}$ ), embora este ainda tenha se apresentado inferior a da água pura quando presente a 10% (m/m). Considerando a AMOX dentre os compostos estudados, por apresentar maior variação de  $\text{p}K_a$  frente às variações de temperatura e composição de etanol, é evidente que o efeito do solvente prevalece sobre a temperatura. Quando a AMOX é sujeita a um aquecimento de 15 °C em água pura, o valor de  $\text{p}K_{a1}$  sofre um aumento em média de 3,0%, enquanto  $\text{p}K_{a2}$  diminui aproximadamente em 6,0%. Todavia, a adição de etanol até 70% causa variações superiores a 50% nos valores de  $\text{p}K_{a1}$ . Esse comportamento pode ser justificado pelo fato do etanol apresentar  $\text{p}K_a$  maior que a água, apresentando maior basicidade que este último. Logo, sua presença diminui a acidez dos grupos carboxílicos. Além disso, um aumento das interações do composto com o solvente, através de pontes de hidrogênio, pode dificultar a desprotonação dos grupos ionizáveis.

A redução da basicidade do grupo amino, decorrente da adição de etanol no meio, é confirmada pelo aumento na amplitude do segundo ponto de inflexão obtido nas curvas potenciométricas.

#### 4.4.3 Comparação com a literatura

Embora vários autores já tenham relatado dados de  $pK_a$  da AMOX, AMP, HPG e PG, a complexidade na determinação dessas propriedades é refletida na dispersão dos dados obtidos. A limitação dos dados medidos em poucas condições de temperatura e composição de solventes dificulta uma comparação mais efetiva dos resultados obtidos. No entanto, é possível notar que as medidas reportadas neste trabalho em meio aquoso concordam satisfatoriamente com dados disponíveis na literatura.

Semelhante ao que foi apresentado anteriormente, Hou e Poole (1969) relataram que o grupo carboxílico de todas as penicilinas tem  $pK_{a1}$  entre 2,6 e 2,7 em água pura a 25 °C, enquanto o grupo amino varia num intervalo entre 7,24 e 7,65, provavelmente decorrente da influência dos grupos adjacentes. Eles observaram também que uma mudança na constante dielétrica afeta mais  $pK_{a1}$  do que  $pK_{a2}$ , enquanto uma mudança na temperatura causa efeito mais acentuado sobre a segunda constante de dissociação.

Na Tabela 4.8 está apresentado dados de  $pK_{a1}$  e  $pK_{a2}$  da AMOX e AMP em solução aquosa disponíveis na literatura, para fins de comparação com os dados obtidos aqui. Bezerra *et al.* (2013) e Santana *et al.* (2010) relataram dados de  $pK_a$  da AMOX e AMP, respectivamente, em água pura nas mesmas temperaturas estudadas aqui. Porém, o estudo mais completo encontrado dentre os compostos estudados demonstra ser o de Crea *et al.* (2012), no qual reporta as constantes de dissociação dos antibióticos em solução aquosa em diferentes temperaturas e força iônica. Comparando com estes dados, os desvios relativos de aproximadamente 4,0, 0,3 e 0,3 % foram obtidos para valores de  $pK_{a1}$ ,  $pK_{a2}$  e  $pK_{a3}$  da amoxicilina, respectivamente; e 2,0 e 0,5% para valores de  $pK_{a1}$  e  $pK_{a2}$  da ampicilina, indicando coerência nos dados obtidos.

A consistência das constantes de dissociação da hidroxifenilglicina e fenilglicina pode ser notada observando a Tabela 4.9, onde se encontram valores destas propriedades disponíveis na literatura em meio aquoso a 25 °C. Nota-se que os dados obtidos neste trabalho apresenta maior concordância com os relatados por Rudolph *et al.* (1999).

A literatura disponibiliza poucos estudos de variações de entalpia e entropia para a desprotonação dos compostos aqui estudados. Valores de  $\Delta H$  reportados por Orabi (2005) para amoxicilina e ampicilina indicaram que são favorecidas as reações de protonação, conforme apresentado aqui. Baseado em dados disponíveis na literatura, a reação de desprotonação de grupos fenólicos em geral é endotérmica, com valores de  $\Delta H$  aproximadamente igual a 24,9 kJ/mol em uma faixa de força iônica entre  $0 \leq I \leq 1,0$  mol/L e

$15 \leq T \leq 40$  °C (CREA *et al.*, 2012). Esse valor é perfeitamente comparável com os valores apresentados na Tabela 4.7, e os apresentados por Crea *et al.* (2012). Não foram encontrados relatos desses dados para HPG e PG até o momento.

**Tabela 4.8 – Valores de  $pK_a$  da amoxicilina e ampicilina em solução aquosa disponíveis na literatura**

Referência	T (°C)	AMOX			AMP	
		$pK_{a1}$	$pK_{a2}$	$pK_{a3}$	$pK_{a1}$	$pK_{a2}$
	25					
Este trabalho		2,68	7,47	9,84	2,64	7,24
BEZERRA <i>et al.</i> (2013)		2,74	6,98	-	-	-
CREA <i>et al.</i> (2012)		2,55	7,5	10,01	2,59	7,24
DEMIRALAY <i>et al.</i> (2012) <sup>a</sup>		2,81 – 3,47	7,37 – 8,04	9,48 – 10,26	2,57 – 3,97	7,04 – 7,54
DIENDER <i>et al.</i> (1998)		2,9	7,4	-	-	-
RUDOLPH <i>et al.</i> (1999)		2,63	7,16	-	2,66	7,24
KUROCHKINA e NYS (2003)		-	-	-	2,38	6,95
SANTANA <i>et al.</i> (2010)		-	-	-	2,14	7,31
	20					
Este trabalho		2,63	7,62	9,97	2,62	7,39
BEZERRA <i>et al.</i> (2013)		2,74	7,1	-	-	-
CREA <i>et al.</i> (2012)		2,53	7,64	10,12	2,59	7,37
ORABI, 2005		2,38	7,34	9,52	-	-
SANTANA <i>et al.</i> (2010)		-	-	-	2,14	7,45
	15					
Este trabalho		2,58	7,75	10,02	2,59	7,54
BEZERRA <i>et al.</i> (2013)		2,72	7,22	-	-	-
CREA <i>et al.</i> (2012)		2,49	7,78	10,15	2,59	7,5
SANTANA <i>et al.</i> (2010)		-	-	-	2,24	7,61
	10					
Este trabalho		2,52	7,91	10,1	2,56	7,74
BEZERRA <i>et al.</i> (2013)		2,66	7,28	-	-	-
SANTANA <i>et al.</i> (2010)		-	-	-	2,27	7,66

<sup>a</sup> Obtido a partir de diferentes metodologias.

Fonte: Autor

**Tabela 4.9 – Valores de  $pK_a$  da hidroxifenilglicina e fenilglicina em solução aquosa e 25 °C disponíveis na literatura**

Referência	HPG		PG	
	$pK_{a1}$	$pK_{a2}$	$pK_{a1}$	$pK_{a2}$
Este trabalho	1,86	8,77	1,80	9,10
DIENDER <i>et al.</i> (1998)	2,20	9,20	-	-
FERNÁNDEZ-LAFUENTE <i>et al.</i> (1996)	-	-	2,20	9,30
KUROCHKINA e NYS (2003)	1,40	8,50	1,96	9,02
RUDOLPH <i>et al.</i> (1999)	1,96	9,02	1,96	9,02
SANTANA <i>et al.</i> (2010)	-	-	2,08	9,14
ULINJ <i>et al.</i> (2001)	2,5	9,2	2,0	9,0
VIEIRA (2003)	-	-	1,96	9,02

Fonte: Autor

#### 4.5 Considerações parciais

Para a determinação das constantes de dissociação foi aplicada a técnica da potenciometria utilizando como método de análise da curva a segunda derivada. A desconsideração da força iônica na dissociação dos compostos não causou prejuízo considerável, uma vez que os resultados obtidos para todos os compostos apresentaram boa concordância com os dados já relatados na literatura.

Sabe-se que menores valores de  $pK_a$  corresponde a maior caráter ácido do grupo funcional ionizável. Além disso, a acidez do grupamento carboxílico diminui com o tamanho da cadeia ligada ao carbono. Isso condiz com os valores de  $pK_{a1}$  da HPG e PG menores que da AMOX e AMP, uma vez que o antibiótico apresenta maior fórmula estrutural ligada a este grupamento que seu subproduto. Já o grupo amino apresenta caráter mais ácido na AMOX e AMP que na HPG e PG. Isso pode ser explicado devido ao efeito indutivo dos grupos adjacentes ao nitrogênio ionizável do antibiótico.

Além da estrutura do composto, a constante de dissociação depende também do meio, especificamente da polaridade do solvente, ou seja, ácidos se tornam mais dissociados em solventes mais polares. Isso confirma o comportamento crescente de  $pK_{a1}$  e  $pK_{a2}$  dos compostos quando relacionados à presença de etanol, uma vez que este apresenta constante dielétrica significativamente inferior que a água, diminuindo a polaridade do meio.

Os valores de  $pK_a$  apresentam consistência frente às variações de temperatura. Isso é confirmado pela correlação linear destas propriedades com a temperatura, obedecendo à equação de Van't Hoff. Com isso, os parâmetros termodinâmicos foram calculados,

mostrando que as reações de desprotonação são reações não espontâneas, em virtude das variações positivas da energia livre de Gibbs.

A obtenção das constantes de dissociação desempenhou papel crucial na elucidação do equilíbrio químico ácido-base entre estas biomoléculas, tornando possível a estimativa de diversas propriedades a partir da identificação da espécie iônica presente.

## **CAPÍTULO 5 – EQUILÍBRIO SÓLIDO-LÍQUIDO DE BIOMOLÉCULAS: EXPERIMENTAL**

### **5.1 Introdução**

A maioria dos processos de purificação de biomoléculas inclui pelo menos uma etapa de cristalização. Esta operação unitária corresponde à formação de uma fase sólida, rica em soluto, a partir de uma solução aquosa contendo este soluto. Essa separação entre fases é alcançada através da mudança de algumas propriedades desta solução aquosa, por exemplo, pH, força iônica, temperatura e concentração de cossolvente. Do ponto de vista termodinâmico, esta operação implica em um equilíbrio sólido-líquido que se estabelece entre a fase sólida contendo biomolécula e a solução aquosa a partir da qual é formada (FRANCO e PESSÔA FILHO, 2011).

A viabilidade da síntese enzimática da amoxicilina e ampicilina representa um grande desafio nos dias atuais, em virtude da enzima PGA hidrolisar ambos antibiótico e substrato, quando estes se encontram presente na fase aquosa. Por isso, o conhecimento dos dados de solubilidade de fármacos é fundamental para a predição e otimização dos processos de síntese. Com o intuito de colaborar na elucidação e otimização da síntese enzimática desses antibióticos, o presente trabalho avaliou a solubilidade da amoxicilina e ampicilina, bem como seus subprodutos hidroxifenilglicina e fenilglicina, respectivamente, em uma ampla faixa de condições operacionais. Levou-se em consideração os efeitos do meio iônico, variando o pH entre 2 e 8; do cossolvente, variando a composição de etanol entre 0 e 70% (m/m); e da temperatura nas condições de 10, 15, 20 e 25 °C.

Este capítulo apresenta alguns conceitos que condizem ao equilíbrio sólido-líquido de moléculas com características aminoácidas e os resultados obtidos no estudo experimental realizado.

### **5.2 Equilíbrio sólido-líquido de moléculas com características aminoácidas**

A condição de equilíbrio entre duas fases distintas é alcançada quando as fases em contato apresentam potenciais químicos iguais, já que a variação da energia livre de Gibbs é igual à zero. Além disso, cada componente apresenta a mesma fugacidade em todas as fases do sistema.

Enquanto o sólido apresenta solubilidade finita no solvente líquido, não há solubilidade apreciável do solvente no sólido. Consequentemente, neste trabalho considera-se apenas a equação de equilíbrio para o componente sólido, representado pelo índice 1. Logo, a condição de equilíbrio é dada pela Equação 5.1,

$$f_{1\text{ puro}}^s = f_1^l \quad (5.1)$$

ou

$$f_{1\text{ puro}}^s = \gamma_1 x_1 f_1^\infty \quad (5.2)$$

onde  $x_1$  é a solubilidade do soluto na fase líquida expressa em fração molar,  $\gamma_1$  é o coeficiente de atividade do soluto na fase líquida,  $f_1^\infty$  é a fugacidade do soluto no estado padrão (diluição infinita) no qual  $\gamma_1$  se refere, e  $f_{1\text{ puro}}^s$  é a fugacidade do soluto puro na fase sólida.

O coeficiente de atividade da fase líquida está relacionado à energia livre de Gibbs molar em excesso, e sua magnitude é primordial para a descrição termodinâmica do equilíbrio de fases, uma vez que mede o afastamento do comportamento ideal da solução e está relacionado com o arranjo molecular na solução e com a formação ou quebra de ligações entre as moléculas no processo de mistura. Assim, na dissolução de um soluto com características aminoácidas, a molécula zwitteriônica tem grande momento de dipolo, o que dá origem a importantes interações iônicas. Quando um ácido ou uma base é adicionado, o contra-íon do ácido ou da base é introduzido à solução, interagindo com as moléculas carregadas do soluto. Consequentemente, não só a concentração da forma zwitteriônica do soluto altera, mas também a formação de íons complexos muda o coeficiente de atividade destes compostos, podendo este ser calculado usando um dos vários modelos termodinâmicos existentes.

É possível determinar a solubilidade do soluto segundo a Equação 5.3, onde as fugacidades dependem apenas das propriedades do soluto (PRAUSNITZ *et al.*, 1999).

$$x_1 \gamma_1 = \frac{f_{1\text{ puro}}^s}{f_1^\infty} \quad (5.3)$$

A partir da definição de fugacidade, a razão  $f_{1\text{ puro}}^s / f_1^\infty$  está relacionada com a temperatura do sistema através da Equação 5.4.

$$\frac{f_{1\text{ puro}}^s}{f_1^\infty} = \exp\left(\frac{\Delta s_1}{R} - \frac{\Delta h_1}{RT}\right) \quad (5.4)$$

onde  $\Delta s_1$  e  $\Delta h_1$  são respectivamente a variação da entropia e entalpia molares do soluto do estado sólido ao estado padrão e  $T$  é a temperatura absoluta. Combinando as Equações 5.3 e 5.4, obtém-se a solubilidade pela Equação 5.5.

$$x_1\gamma_1 = \exp\left(\frac{\Delta s_1}{R} - \frac{\Delta h_1}{RT}\right) \quad (5.5)$$

Quando o soluto existe em um único estado de ionização na fase líquida, a Equação 5.5 é suficiente para calcular o equilíbrio sólido-líquido. No entanto, quando temos um composto com características aminoácidas, deve-se levar em conta o fato de que as moléculas se encontram em muitos estados de ionização na solução aquosa. A presença de diferentes estados de ionização na fase líquida não altera a descrição do equilíbrio sólido-líquido. Neste caso, é válida uma equação similar à Equação 5.1, porém considerando o equilíbrio apenas entre as moléculas neutras (zwitteriônicas) pelo fato de que a fase sólida, como uma fase estável em equilíbrio, é eletricamente neutra, sendo constituída apenas por moléculas neutras. Neste caso, a Equação 5.5 representa a solubilidade das moléculas neutras ( $x_{1\pm}$ ), independente do meio iônico em que se encontra a solução.

A solubilidade determinada experimentalmente é a concentração global de todas as moléculas, independente de sua carga (FRANCO e PESSÔA FILHO, 2011). Isso significa que ela é composta por uma solubilidade característica do soluto independente do pH, equivalente à concentração de *zwitterions* ( $x_{1\pm}$ ); e as concentrações das formas catiônica e aniônica dependentes do pH ( $x_{1+}$  e  $x_{1-}$ ) determinadas pelas correspondentes constantes de dissociação  $K_{a1}$  e  $K_{a2}$ . Logo, partindo de um balanço de massa cujas concentrações de moléculas catiônicas e aniônicas são calculas pelas Equações 2.2 e 2.3, e a de moléculas zwitteriônicas pela Equação 5.5, a solubilidade de compostos com características aminoácidas em função do pH pode ser representada pela Equação 5.6:

$$x_1\gamma_{1\pm} = \left[1 + \frac{[H^+]}{K_{a1}}\left(\frac{\gamma_{1\pm}}{\gamma_{1+}}\right) + \frac{K_{a2}}{[H^+]}\left(\frac{\gamma_{1\pm}}{\gamma_{1-}}\right)\right] \exp\left(\frac{\Delta s_1}{R} - \frac{\Delta h_1}{RT}\right) \quad (5.6)$$

em que os símbolos  $\pm$ ,  $+$  e  $-$  representam as formas zwitteriônica, catiônica e aniônica respectivamente,  $[H^+]$  é a concentração de íons de hidrogênio na solução e  $K_i$  as constantes de equilíbrio definidas no capítulo anterior deste trabalho.

### 5.3 Fatores que influenciam a solubilidade de moléculas com características aminoácidas

Embora dados de solubilidade de compostos bioquímicos apresentem uma ampla aplicação e importância na indústria farmacêutica, existem poucos relacionados a antibióticos  $\beta$ -lactâmicos em soluções aquosas disponíveis na literatura, encontrando com maior frequência dados de sistemas contendo aminoácidos e proteínas.

Para biomoléculas que apresentam características aminoácidas, devido a presença de grupos carregados positiva e negativamente em solução, estas moléculas irão interagir umas com as outras e com o solvente. Logo, a solubilidade destes compostos está relacionada com as interações de superfície hidrofóbicas (soluto-soluto) e hidrofílicas (soluto-solvente), e é afetada por diversos fatores tais como a estrutura da molécula e condições do meio (pH, temperatura, força iônica, além do tipo e concentração de sais presentes). Se as interações soluto-soluto são grandes e as interações soluto-solvente são pequenas, o soluto tenderá a ser insolúvel (PEREGRINE e GASPARETTO, 2005).

Baseando-se no estudo de solubilidade da ampicilina, amoxicilina, hidroxifenilglicina e fenilglicina apresentado neste trabalho, a seguir serão abordadas de maneira sucinta as condições do meio de maior influência na solubilidade destes compostos.

#### 5.3.1 Efeito do pH

A presença das cargas elétricas ao longo da molécula destaca-se dentre os vários fatores que influenciam na sua solubilidade, sendo a natureza e distribuição dessas cargas função tipicamente do pH do meio. Nesse sentido, em geral, moléculas com características aminoácidas são mais solúveis em pHs baixos (ácidos) ou elevados (alcalinos), pois a existência de cargas positiva ou negativa em excesso estabelece um estado de repulsão entre as próprias moléculas. Esta condição favorece as interações com o solvente, aumentando desta maneira a solubilidade do soluto (MOHAN *et al.*, 2007; PEREGRINE e GASPARETTO, 2005).

De acordo com as observações de vários autores (KAKALIS e REGENSTREIN, 1986; TSUJI *et al.*, 1978; WONG *et al.*, 1996), quando uma solução de compostos com características aminoácidas está no seu ponto isoelétrico, ou seja, quando a molécula num sistema aquoso apresenta carga líquida nula decorrente do equilíbrio entre o número de cargas positivas e negativas, as interações soluto-soluto aumentam, pois as forças eletrostáticas intermoleculares estão num máximo. Consequentemente, menos água interage com as

moléculas, sendo essa condição favorável para que estas moléculas se aproximem entre si formando aglomerados que, cada vez maiores, tendem a precipitar. Em outras palavras, quanto mais próximo o pH de uma solução contendo moléculas com características aminoácidas for do seu ponto isoelétrico, menor será a solubilidade deste composto.

### 5.3.2 Efeito da temperatura

As biomoléculas possuem uma estrutura química bem definida da qual dependem fundamentalmente suas propriedades físicas, químicas e biológicas. Em geral, a solubilidade destes compostos é aumentada com a temperatura devido ao fato do calor provocar um aumento na energia cinética de suas moléculas, facilitando a interação destas com o solvente. Ainda assim, há relatos disponíveis na literatura do comportamento direta e inversamente proporcional da solubilidade com a temperatura (Christopher *et al.*, 1998).

Embora seja bem consolidada a relação da solubilidade com as características químicas entre o soluto e solvente, bem como o efeito da temperatura sobre estas características, vale destacar a elevada instabilidade térmica dos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos. Estes compostos apresentam elevada sensibilidade à hidrólise, levando à degradação pela abertura do anel aberto  $\beta$ -lactâmico (Mendez *et al.*, 2008). Este fenômeno causa alterações nas diversas propriedades antibacteriana, química e termodinâmica.

### 5.3.3 Efeito da força iônica

A adição de sal em uma solução ocasiona um aumento na concentração de íons dissolvidos e, conseqüentemente, na sua força iônica. Segundo Tomé *et al.* (2010), o efeito desses sais na solubilidade de moléculas aminoácidas é bem documentada e estabelecida, sendo esta propriedade afetada pela natureza e concentração de ambos o cátion e o ânion do eletrólito.

Quando pequenas quantidades de sal são adicionadas a uma solução contendo moléculas com características aminoácidas, as cargas provenientes da dissociação desse sal passam a interagir com as cargas do soluto, reduzindo as interações soluto-soluto. Isso favorece as interações hidrofílicas soluto-solvente e, conseqüentemente, a solubilidade do composto. A esse fenômeno dá-se o nome de "*salting-in*".

No entanto, em condições de elevada força iônica, decorrente da adição de grandes quantidades de sal, a água apresentando grande poder de solvatação passa a interagir com as

duas espécies: o soluto e os íons provenientes da dissociação do sal. Porém, as moléculas de água apresentam maior tendência a solvatação de partículas menores, abandonando então a estrutura do soluto para interagir com os íons. Em outras palavras, o sal causa uma desidratação do soluto proveniente do deslocamento das moléculas de água. Nestas condições, as moléculas aminoácidas tornam-se suscetíveis às interações intermoleculares, diminuindo sua solubilidade em meio aquoso e, conseqüentemente, favorecendo a precipitação (TOMÉ *et al.*, 2010; ZHANG *et al.*, 2005). A esse fenômeno de diminuição da solubilidade do soluto em decorrência de um considerável aumento da força iônica do meio dá-se o nome de "*salting-out*".

### 5.3.4 Efeito de solventes orgânicos

Experiências têm mostrado que a adição de substâncias orgânicas reduz a solubilidade de proteínas em meio aquoso. Portanto, as substâncias orgânicas constituem agentes de *salting-out*. Segundo Arakawa e Timasheff (1985) *apud* Ruckenstein e Shulgin (2006), este efeito *salting-out* é resultado da diminuição da constante dielétrica e da redistribuição de moléculas de água e solventes orgânicos em torno da molécula da proteína, ou seja, as interações preferenciais de componentes solventes com a proteína.

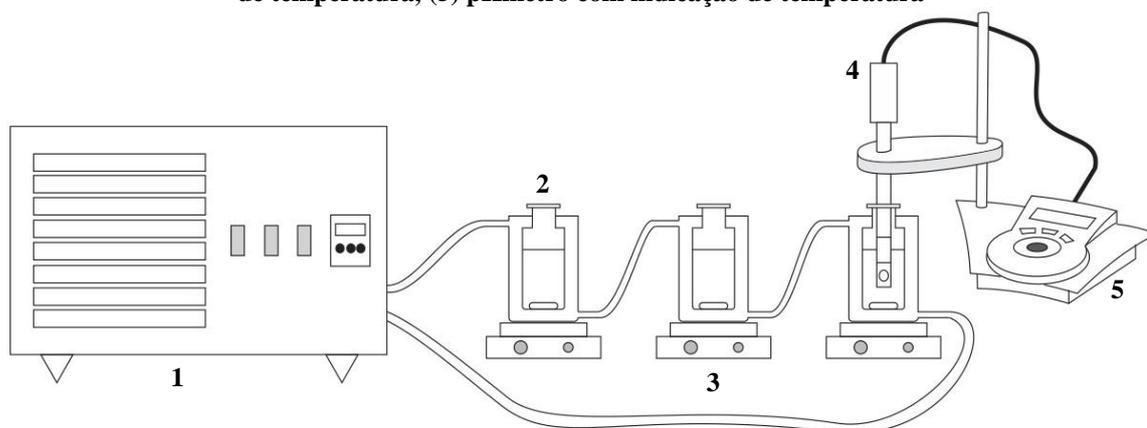
Qualquer agente que altere a constante dielétrica de uma solução aquosa influencia na solubilidade das proteínas. Essa constante dielétrica é uma característica de cada solvente e mede a capacidade deste manter as moléculas de soluto afastadas entre si quando em solução, definida a partir do conceito de forças coulombianas.

A água apresenta constante dielétrica bastante elevada, isto é, possui grande capacidade de separação das moléculas de soluto. Assim, em uma solução contendo exclusivamente água e moléculas proteicas, as interações água-proteína prevalecem sobre as interações proteína-proteína. Já os solventes orgânicos apresentam valor de constante dielétrica bem inferior a da água. Assim, em soluções contendo estas substâncias, as moléculas encontram-se mais próximas umas das outras devido à força de atração entre cargas opostas. Logo, as interações proteína-proteína sobrepõem ao poder de solvatação do solvente (interação solvente-proteína), favorecendo a sua precipitação. Devido a esses fatores, em geral, a solubilidade das proteínas em solventes orgânicos é menor do que em água.

## 5.4 Metodologia experimental

Os ensaios de solubilidade basearam-se no método analítico de saturação proposto por Gude *et al.* (1996) e adaptado por Bezerra *et al.* (2013). A fim de reduzir o tempo experimental sem prejudicar a precisão e confiabilidade dos resultados obtidos, o presente trabalho propõe substituir a etapa de sedimentação desenvolvida pelos últimos autores por simples filtração, para a obtenção da solução saturada dos compostos sem a presença de soluto em excesso. A configuração experimental utilizada para os ensaios de solubilidade está apresentada na Figura 5.1.

**Figura 5.1 – Esquema do aparato experimental utilizado para os ensaios de solubilidade: (1)banho termostático, (2) célula de equilíbrio enjaquetada, (3) agitador magnético, (4) eletrodo de pH com sensor de temperatura, (5) pHmetro com indicação de temperatura**



Fonte: Autor.

Inicialmente 25 mL da mistura água+etanol (preparada gravimetricamente) foi colocado dentro de cada célula de equilíbrio enjaquetada, até atingir a estabilidade térmica. As concentrações de água e etanol usadas foram 0, 10, 30, 50 e 70% (m/m) de etanol. A estabilidade da temperatura foi determinada através do sensor de temperatura NTC acoplado ao pHmetro e controlada por um banho termostático. Em seguida, soluto foi adicionado à mistura de solventes sob agitação até obter soluções saturadas com excesso de soluto não dissolvido. Em cada célula, o pH foi ajustado até o valor desejado por adição de solução NaOH 0,1 molal ou HCl 0,1 molal nas mesmas condições cossolvente. Então, as soluções saturadas foram submetidas à agitação magnética constante para a obtenção do equilíbrio entre as fases sólida e líquida. O tempo de agitação variou de acordo com o soluto e a composição de etanol, conforme apresentado na Tabela 5.1, determinado experimentalmente.

**Tabela 5.1 – Tempo de agitação utilizado nos ensaios de solubilidade**

Componente	$w_2$ (%)	Tempo (h)
AMOX	0, 10 e 30	4
	50 e 70	5
AMP	0, 10 e 30	7
	50 e 70	8
HPG	0, 10 e 30	4
	50 e 70	5
PG	0, 10 e 30	4
	50 e 70	5

$w_2$  = fração mássica de etanol em água livre de soluto.

Fonte: Autor

Ao término deste tempo, o pH foi medido e uma pequena alíquota (aproximadamente 4 ml) foi retirada da solução por uma seringa acoplada a um filtro de 0,20  $\mu\text{m}$  para garantir a total ausência de partículas sólidas em suspensão. Para confirmar que o equilíbrio foi alcançado durante o tempo de agitação mencionado acima, a solução remanescente na célula foi novamente submetida à agitação por uma hora, e por fim repetida a leitura do pH e coleta da segunda alíquota para aquisição da duplicata.

A partir de cada alíquota foram obtidas duas amostras por diluição e analisadas em um espectrofotômetro na região do UV-visível para quantificação da concentração de soluto. Portanto, cada resultado de solubilidade obtida experimentalmente corresponde à média das diferentes medidas com base na reprodutibilidade e repetitividade das quatro amostras sucessivas. O desvio padrão das medidas  $u(x)$  foi definido pela Equação 4.6.

As curvas de calibração utilizadas nas análises do espectrofotômetro encontram-se no Apêndice C.

## 5.5 Resultados e discussão

### 5.5.1 Tempo de agitação

Diversos autores propuseram diferentes metodologias para a determinação da solubilidade de antibióticos.

Bezerra *et al.* (2013) usaram células de equilíbrio encamisadas cuja as soluções saturadas foram agitadas por 3 h e as suspensões resultantes deixadas em repouso por 2 h. O equilíbrio de fases foi confirmado deixando as soluções remanescentes nas células novamente

em agitação por 3 h e repouso por 2 h. O sobrenadante das amostras foi analisado através de um espectrofotômetro em UV-visível.

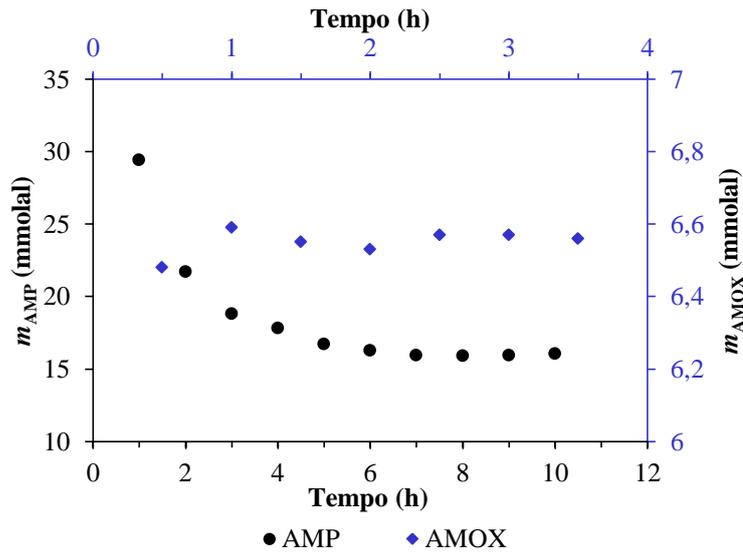
Santana *et al.* (2010) utilizaram um *shaker* com temperatura controlada onde as soluções saturadas foram agitadas por 6 h e as suspensões resultantes deixadas em repouso por 1 h, sendo o sobrenadante analisado através de um espectrofotômetro em UV-visível para 6-APA e PG, e por HPLC para a ampicilina.

Vieira (2003), Rudolph *et al.* (1999), Diender *et al.* (1998) e Gude *et al.* (1996) prepararam as amostras gravimetricamente e colocaram em frascos imersos em um banho termostaticado sob agitação. Os dois primeiros autores deixaram os frascos em agitação por pelo menos 4 h, os demais mantiveram por mais de 48 h para assegurar o equilíbrio. Em seguida as suspensões foram deixadas sedimentar e o sobrenadante de todos os compostos analisado em HPLC.

Neste trabalho, optou-se por utilizar o mesmo sistema experimental adotado por Bezerra *et al.* (2013). O tempo de agitação é um parâmetro fundamental para alcançar o equilíbrio, entretanto seu valor diverge consideravelmente entre os diferentes autores. Portanto, testes preliminares foram realizados para determinar o tempo de agitação mínimo necessário nos ensaios de solubilidade. Estes testes foram realizados com AMOX e AMP em água pura a 25 °C, e seguiram o procedimento descrito na seção anterior, mas com a retirada das alíquotas sendo realizada em pequenos intervalos de tempo. Os resultados obtidos estão apresentados na Figura 5.2.

Após 2h e 30 min observa-se que não há variação significativa da concentração de AMOX nas amostras. Porém, com a presença do etanol no sistema, notou-se a necessidade de um período maior de agitação para alcançar o equilíbrio entre as fases. Por isso, para todos os compostos estudados foi aumentado 1h no tempo de agitação nos sistemas contendo 50 ou 70% de etanol. A AMP apresentou um comportamento diferente dos demais, uma vez que o mesmo tendeu a solubilizar mais no início do ensaio, e ao longo do tempo retornou à fase sólida até atingir o equilíbrio, indicando 7 h como o tempo mínimo necessário de agitação para atingir o equilíbrio de fases entre o soluto e solvente envolvidos.

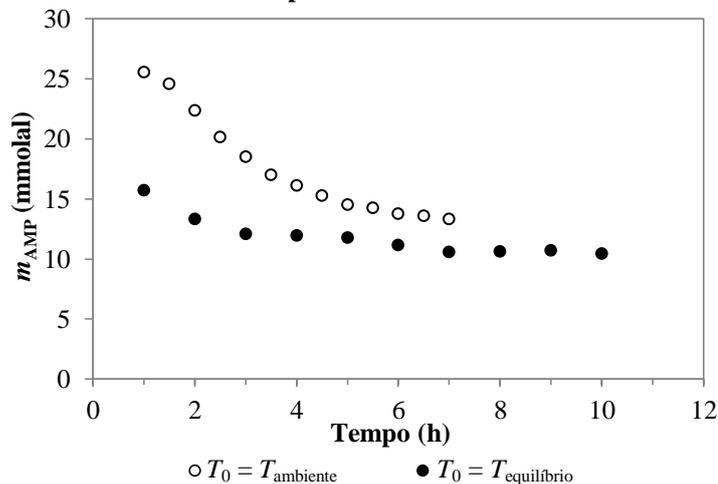
**Figura 5.2 – Concentração dos antibióticos em água pura a 25 °C em função do tempo de agitação**



Fonte: Autor.

A influência da temperatura de partida do solvente sobre as condições de equilíbrio também foi verificada. Para isso, dois ensaios seguindo o procedimento de saturação foram realizados. Em uma célula a ampicilina foi adicionada à água partindo da temperatura ambiente ( $T_0 = T_{\text{ambiente}}$ ) e depois submetida a resfriamento até atingir o equilíbrio entre as fases à 10 °C. Em outra célula, o antibiótico foi adicionado ao meio aquoso com a temperatura de equilíbrio já estabilizada em 10 °C ( $T_0 = T_{\text{equilíbrio}}$ ). Conforme observado nos resultados mostradas na Figura 5.3, quando o composto é adicionado no meio solvente ainda em temperatura ambiente, o tempo de agitação necessário para alcançar a condição de equilíbrio é consideravelmente maior.

**Figura 5.3 – Efeito da temperatura inicial da solução no equilíbrio sólido-líquido da ampicilina em água pura a 10 °C**



Fonte: Autor.

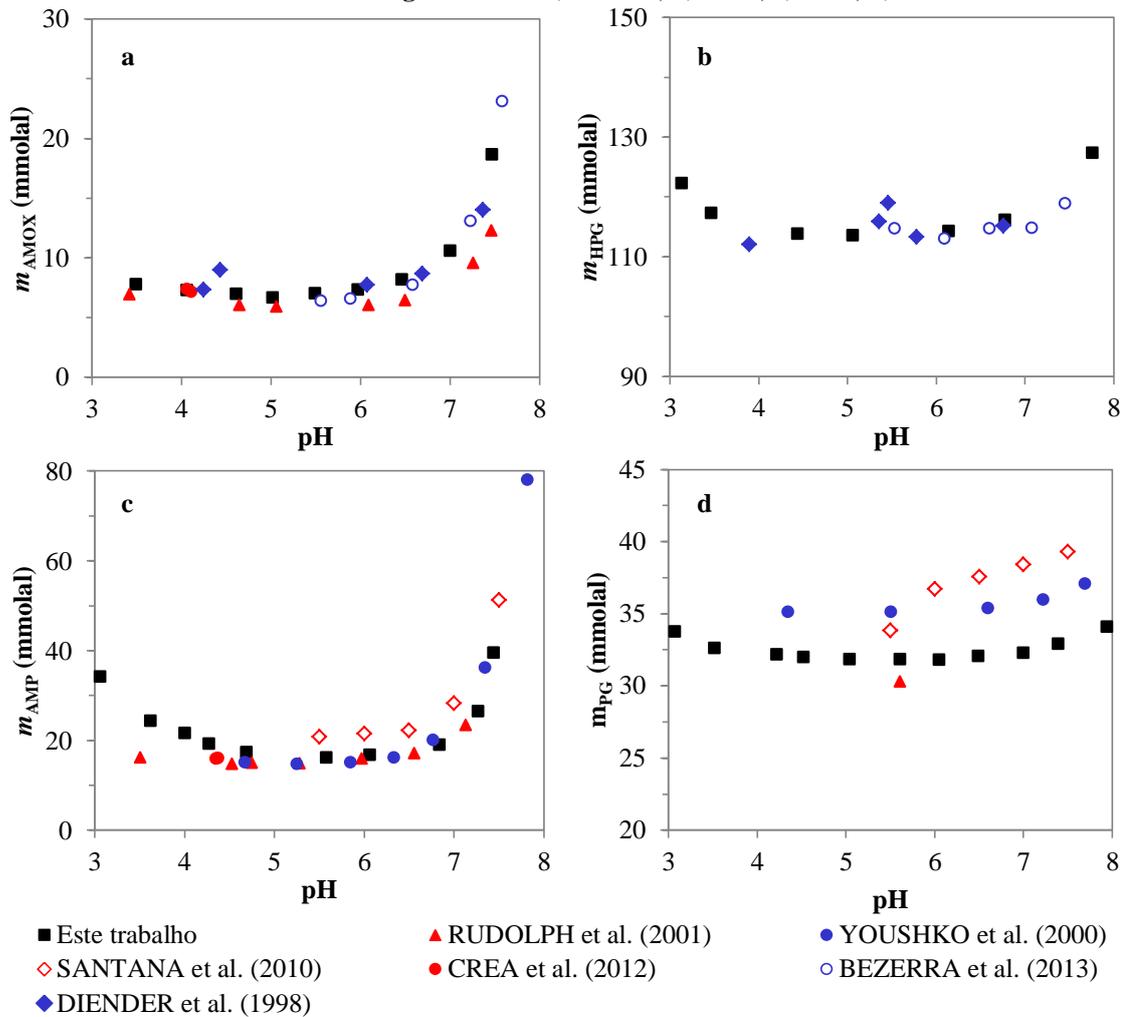
### 5.5.2 Validação da metodologia

A extensa pesquisa bibliográfica sobre a disponibilidade de dados de solubilidade e métodos experimentais, citada no Capítulo 2, foi fundamental para estabelecer um programa experimental sistemático e aplicar a técnica apropriada para determinar a solubilidade dos antibióticos e seus subprodutos em soluções aquosas contendo etanol, a diferentes temperaturas e meio iônico. É importante ressaltar que existem complexidades inerentes a essas medições experimentais, sendo a precisão e confiabilidade dos dados difíceis de serem alcançadas. Estas dificuldades podem estar relacionadas com a pureza dos compostos, diferenças em suas estruturas sólidas, pH, controle de temperatura, e o método de medição da solubilidade (MOTA *et al.*, 2009).

O método analítico já foi provado ser bem sucedido com boa reprodutibilidade e precisão, segundo estudos relatados. A técnica espectrofotométrica forneceu um erro estimado de 0,02 mmolal na concentração dos compostos, inerente a precisão do equipamento e incerteza da etapa de diluição. Além disso, todas as curvas de calibração apresentaram coeficientes correlação lineares ( $R^2$ ) superiores a 0,999.

As informações existentes na literatura são escassas, na sua maioria antiga e limitada a poucos solventes, sais e outras condições. A influência da temperatura é quase sempre ignorada; a grande maioria dos dados publicados é a 25 °C. Assim, uma comparação entre os dados de solubilidade obtidos experimentalmente e os disponíveis na literatura é mostrada na Figura 5.4.

Figura 5.4 – Comparação dos dados experimentais de solubilidade dos compostos com dados disponíveis na literatura em água a 25°C: a) AMOX, b) HPG, c) AMP, d) PG



Fonte: Autor.

A dificuldade em determinar os dados de solubilidade no mesmo pH impede a comparação numérica entre os diferentes autores. No entanto, um desvio relativo de 1,81% foi obtido quando comparada a solubilidade da AMOX obtida em pH igual a 4,06 com o valor reportado por Crea *et al.* (2012) nesta mesma condição. Além disso, é evidente a conciliação entre os dados medidos e os relatados por Diender *et al.* (1998) para AMOX e HPG. Embora o ajuste da curva de solubilidade da AMOX seja ineficaz com os dados de Rudolph *et al.* (2001), a tendência de ambas as curvas foi semelhante. Por outro lado, a curva de solubilidade da AMP coincidiu satisfatoriamente com os dados apresentados por Rudolph *et al.* (2001) e Youshko *et al.* (2000). Ainda que a curva de solubilidade de PG apresente uma discrepância significativa entre os valores obtidos por diferentes autores, o resultado encontrado foi condizente com o comportamento esperado para moléculas aminoácidas e apresentado por

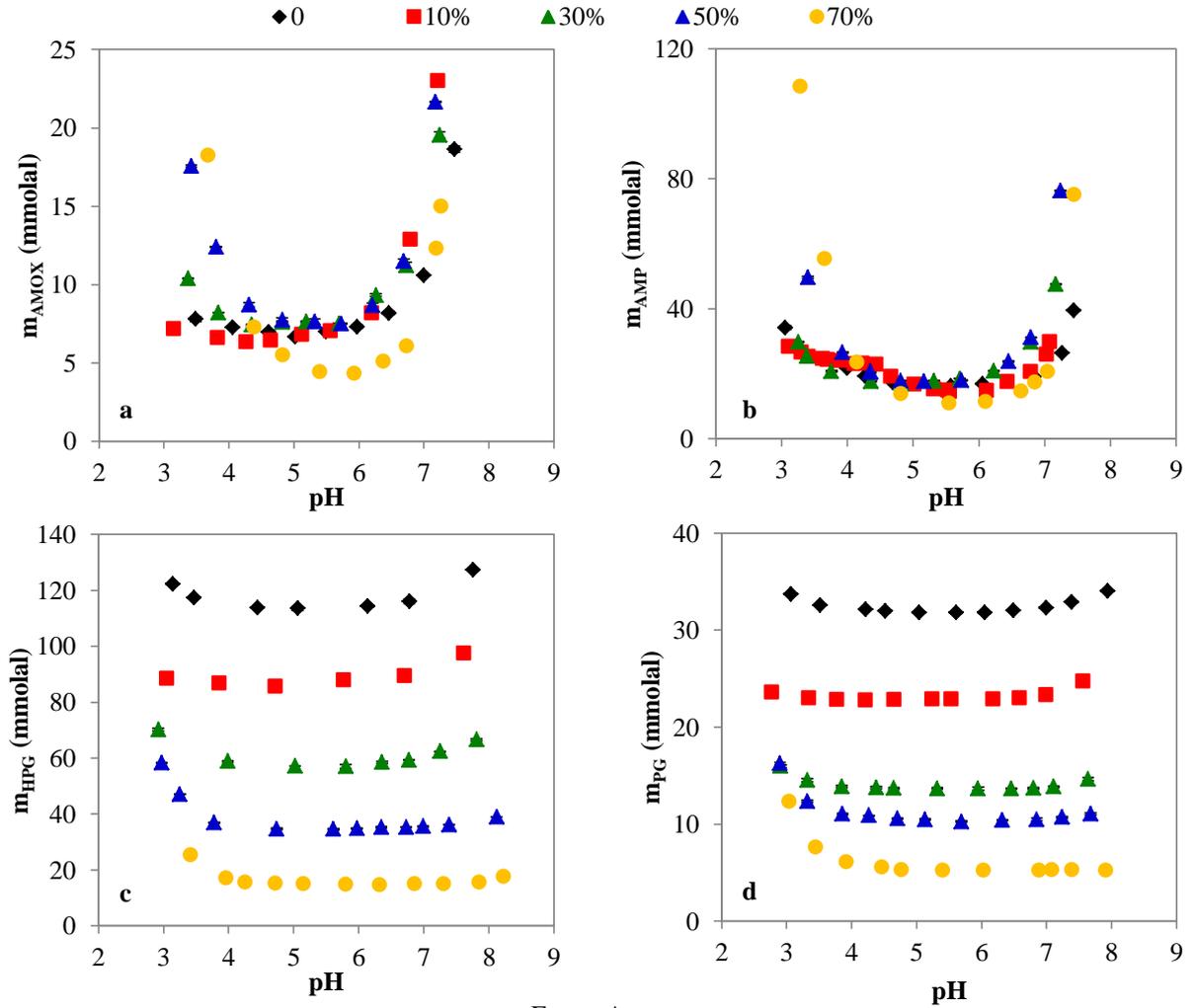
Youshko *et al.* (2000). A divergência nos resultados relatados entre os diferentes autores pode estar associada à complexidade na investigação destas moléculas, considerando a necessidade de rigorosa precisão na manipulação dos experimentos.

A reprodutibilidade entre as curvas de solubilidade da AMOX e HPG obtidas e os dados apresentados por Bezerra *et al.* (2013) significa que a etapa de sedimentação após agitação das soluções em suspensão proposto por estes autores pode facilmente ser substituída por simples filtração a 0,20  $\mu\text{m}$ , sem ocasionar qualquer alteração prejudicial no resultado final, reduzindo consideravelmente o tempo gasto para realização do procedimento experimental.

### 5.5.3 Resultados experimentais

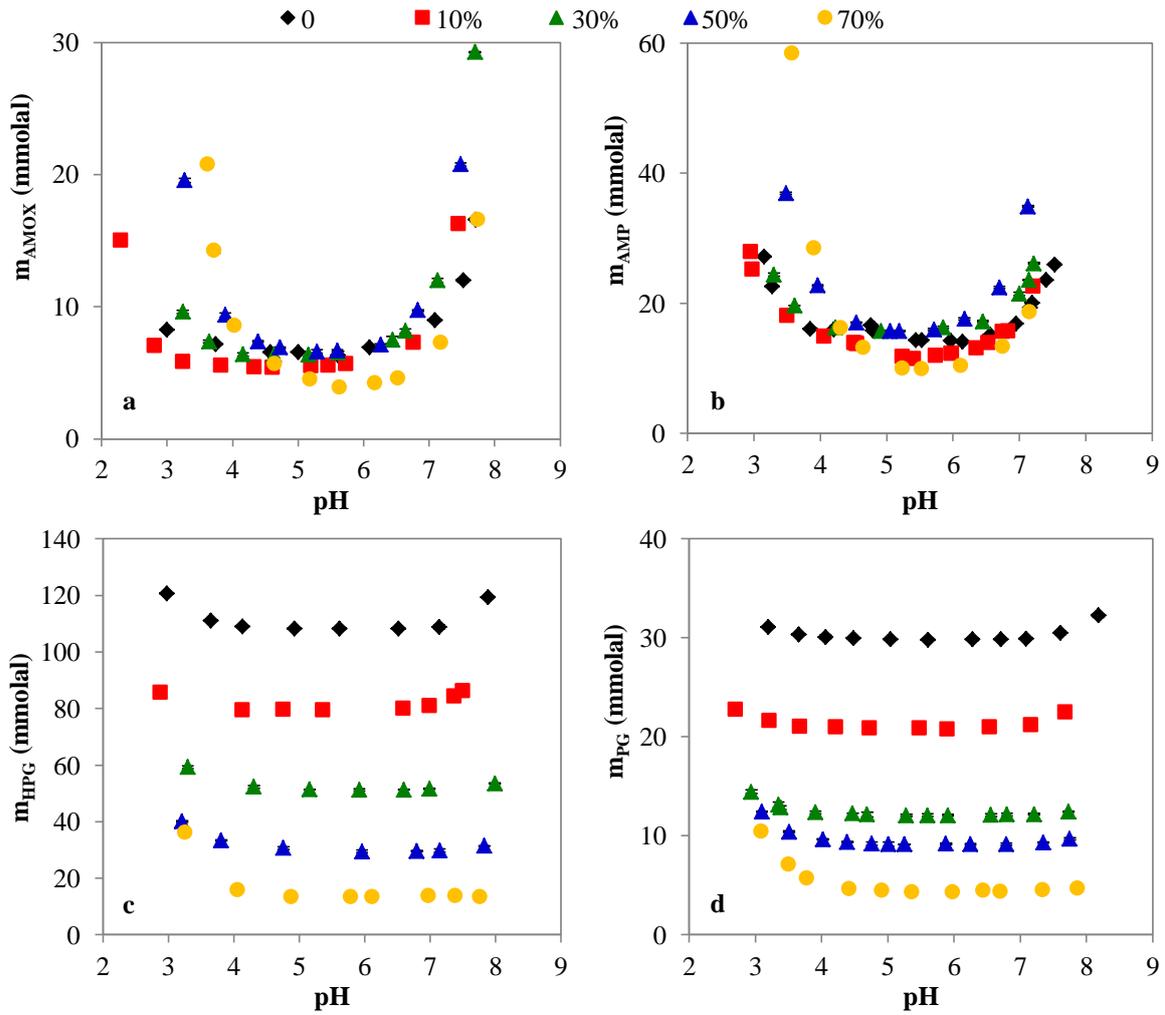
A solubilidade pode ser influenciada pela pureza do soluto, propriedades termofísicas, polimorfismo, temperatura, pressão e pH da solução, entre outros fatores. Diante disso, o principal objetivo deste trabalho foi ampliar a disponibilidade de dados de solubilidade da amoxicilina e ampicilina, bem como de seus subprodutos, considerando o efeito da temperatura, pH e cossolvente. Os resultados obtidos estão apresentados graficamente nas Figuras 5.5 a 5.8 e numericamente no Apêndice D. Todos os gráficos apresentam barras de erro indicando a incerteza dos resultados obtidos. Na maioria dos casos, seu valor é pequeno o suficiente para torná-lo imperceptível sob os símbolos.

Figura 5.5 – Dados experimentais de solubilidade dos compostos em temperatura  $T = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$  e pressão atmosférica  $p = 0,1013\text{ MPa}$ : (a) AMOX, (b) AMP, (c) HPG, (d) PG



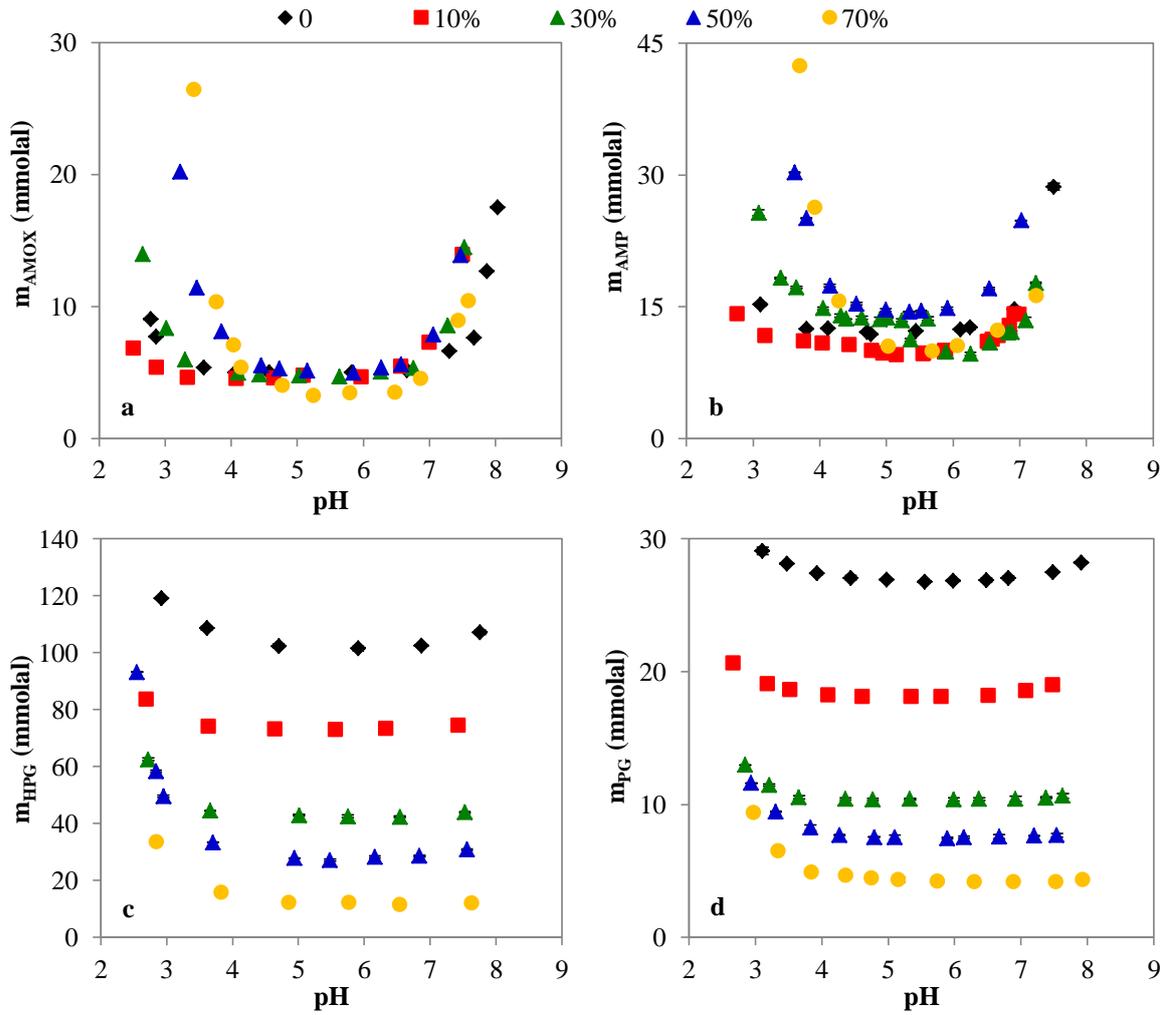
Fonte: Autor

Figura 5.6 – Dados experimentais de solubilidade dos compostos em temperatura  $T = 20\text{ }^{\circ}\text{C}$  e pressão atmosférica  $p = 0,1013\text{ MPa}$ : (a) AMOX, (b) AMP, (c) HPG, (d) PG



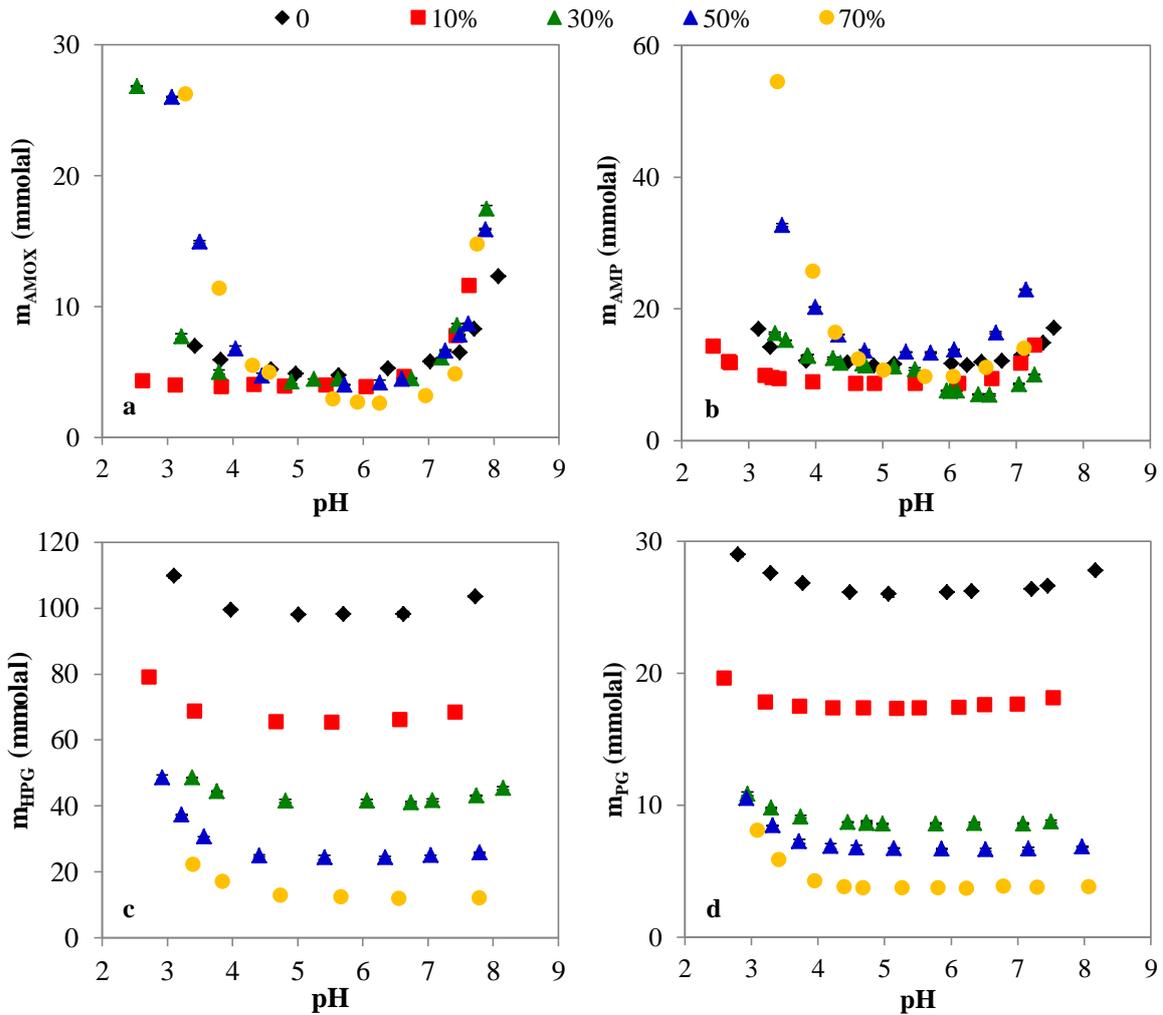
Fonte: Autor

Figura 5.7 – Dados experimentais de solubilidade dos compostos em temperatura  $T = 15\text{ }^{\circ}\text{C}$  e pressão atmosférica  $p = 0,1013\text{ MPa}$ : (a) AMOX, (b) AMP, (c) HPG, (d) PG



Fonte: Autor

Figura 5.8 – Dados experimentais de solubilidade dos compostos em temperatura  $T = 10\text{ }^{\circ}\text{C}$  e pressão atmosférica  $p = 0,1013\text{ MPa}$ : (a) AMOX, (b) AMP, (c) HPG, (d) PG



Fonte: Autor

### 5.5.3.1 Efeito associado à estrutura química

Avaliando a solubilidade dos compostos em água pura em uma mesma temperatura, é possível observar uma sequência  $\text{HPG} > \text{PG} > \text{AMP} > \text{AMOX}$ . Esse comportamento mostra, como esperado, que a solubilidade diminui como o tamanho da cadeia. Entretanto, examinando o par de compostos HPG e PG, é possível observar que a solubilidade da PG é consideravelmente menor que da HPG, confirmando que a mudança de um átomo de hidrogênio por uma hidroxila torna a molécula mais hidrofílica.

Embora também apresente uma hidroxila em sua estrutura, a solubilidade da AMOX não obedece a esse conceito devido ao efeito competitivo entre a cadeia mais longa e o grupo  $-\text{OH}$ . Rudolph *et al.* (1999) destacam ainda que AMOX e AMP são mais hidrofóbicas que HPG e PG.

Ferreira (2008) relatou o mesmo comportamento apresentado entre os compostos estudados neste trabalho, quando estudou a solubilidade de cinco aminoácidos com diferentes tamanhos estruturais e grupos funcionais.

### 5.5.3.2 Efeito do pH

Os compostos estudados apresentaram efeito significativo do pH, exibindo variação expressiva dos dados de solubilidade obtidos. Em água pura e 25 °C, por exemplo, a solubilidade da AMOX sofreu um aumento de até 175% quando a solução passou de pH 5,02 para 7,47. Essa mesma tendência crescente ocorre no sentido de pH menor que 5,02. Variações de mesma magnitude também foram observadas na solubilidade da AMP.

A região de pH no qual foram realizadas as medidas de solubilidade da AMOX e AMP abrange desde valores inferiores a  $pK_{a1}$  (no caso dos sistemas contendo 70% de etanol) até valores superiores a  $pK_{a2}$ . Por isso, o aumento da solubilidade ocorre devido à presença de cargas elétricas predominantemente positivas ou negativas na molécula, cuja intensidade aumenta à medida que se afasta o pH do pI. Nestas condições, cargas elétricas positivas ou negativas em excesso causam interações repulsivas entre si, favorecendo as interações entre o antibiótico e moléculas de água. Conforme foi apresentado no capítulo anterior, na região limitada entre  $pK_{a1}$  e  $pK_{a2}$  há predominantemente moléculas zwitteriônicas, nas quais sofrem interações atrativas entre si devido as cargas opostas. Por isso espera-se que no pI a solubilidade seja mínima. Isto explica as isotermas de solubilidade mostrarem perfis em forma de U, consistente com o comportamento esperado para as moléculas que contêm grupos amino e ácido carboxílico (BEZERRA *et al.*, 2013; MOHAN *et al.*, 2007; PEREGRINE e GASPARETTO, 2005; SANTANA *et al.*, 2010; TSENG *et al.*, 2009).

Essas informações estão de acordo com os resultados apresentados, uma vez que a menor solubilidade foi encontrada em valores de pH próximo aos pI apresentados no Capítulo 4. No entanto, é importante destacar que a AMP apresentou comportamento anômalo em concentrações de etanol variando de 0 a 30% a depender da temperatura de equilíbrio. Nestas condições, a solubilidade apresentou valores menores que a solubilidade no pI, quando NaOH foi usado para ajuste do pH, quebrando a tendência U das isotermas. Esse assunto será abordado mais detalhadamente adiante.

Bezerra *et al.* (2013), Diender *et al.* (1998), Rudolph *et al.* (1999) e Santana *et al.* (2010) citaram que HPG e PG não sofrem efeito significativo do pH, quando comparados aos seus correspondentes antibióticos. Esse mesmo comportamento foi observado nos sistemas

com baixa concentração de etanol. Isto ocorre devido a faixa de pH considerada abranger valores intermediários a  $pK_{a1}$  e  $pK_{a2}$  da HPG e PG, na qual há predominância das moléculas zwitteriônicas. Nesta região a concentração de moléculas catiônicas e aniônicas é bem inferior, exercendo pouca influência nas interações intermoleculares. Como a adição de etanol no meio ocasiona um aumento significativo de  $pK_{a1}$ , a presença de moléculas catiônicas pode ser facilmente percebida pelo aumento na intensidade com a qual a solubilidade de HPG e PG varia em baixos valores de pH. A ausência das moléculas aniônicas nos sistemas contendo HPG e PG é confirmada pelos resultados de  $pK_{a2}$  obtidos que apresentaram-se maior que a região de pH estudada. Isso justifica tal propriedade se manter próxima ao seu valor mínimo na região de pH básico, principalmente em elevadas concentrações de etanol (50 e 70%).

#### 5.5.3.3 Efeito da temperatura

É possível observar que para todos os compostos estudados, a solubilidade aumenta com a temperatura, confirmando o comportamento relatado por Rudolph *et al.* (1999). Em água pura, esse aumento correspondeu a 37, 42, 17 e 22 % para AMOX, AMP, HPG e PG respectivamente, quando submetidos a aquecimento de 10 à 25 °C. Com exceção da AMP, essa porcentagem se mostrou maior na presença de 70% de etanol. Essa análise foi feita a partir das duas medidas no ponto isoelétrico.

Ao estudar a solubilidade de uma proteína na faixa de 0 à 40 °C, Petsev *et al.* (2001) sugerem que a baixa dependência da temperatura sobre essa propriedade é devido a entalpia de fusão tender a zero, e o ganho de entropia ser essencialmente constante no intervalo de temperatura. Já Rudolph *et al.* (1999) comentaram que os valores da entalpia e entropia têm um forte impacto sobre a representação da solubilidade, sugerindo estudos adicionais para obter uma ideia mais clara sobre a entalpia e entropia de fusão.

#### 5.5.3.4 Efeito cossolvente do etanol

A água tem uma constante dielétrica superior ao etanol, capaz de variar a polaridade do solvente conforme a composição. Consequentemente, em meio aquoso as moléculas hidrofóbicas dos antibióticos apresentam menor interação eletrostática, devido ao elevado momento de dipolo da água. Logo, espera-se que a solubilidade dos antibióticos diminua com o aumento na polaridade do meio solvente.

A mudança da composição do solvente desde água pura até 70% de etanol apresentou efeitos significativos na solubilidade dos antibióticos e seus subprodutos. Nas curvas de solubilidade da AMOX observa-se que a adição de etanol aumentou a solubilidade do antibiótico até um máximo, quando a mistura água + etanol atinge 50% de etanol. Considerando os dados de solubilidade da AMP somente nos sistemas contendo 50 e 70%, devido ao comportamento inesperado das demais composições, é evidente a repetitividade deste fenômeno. Esse comportamento também foi observado por Ferreira (2008), Gandhi e Murthy (2012), Orella e Kirwan (1989 e 1991), Rudolph *et al.* (1999), entre outros, no estudo tanto de aminoácidos quanto de fármacos. Segundo Orella e Kirwan (1989 e 1991) e Gandhi e Murthy (2012), essa solubilidade melhorada em altas concentrações de etanol (até 50%) é favorecida pelas interações intermoleculares entre as moléculas do soluto e do solvente, devido à redução na constante dielétrica do meio. Neste caso, a água forma uma camada de hidratação que atua entre o antibiótico e o etanol. A máxima solubilidade pode ser atribuída à presença de moléculas de água monoméricas a partir da qual afeta as ligações de hidrogênio com o antibiótico. Por isso observou-se menores valores de solubilidade nas misturas de solvente contendo 70% de etanol. A máxima solubilidade não está relacionada com as alterações de fase sólida, mas sim a um valor ótimo de polaridade das interações soluto-solvente (GANDHI e MURTHY, 2012).

Quando a mistura de cossolventes apresenta baixa concentração de etanol, a quantidade de água conduz à formação de aglomerados, cuja força de hidratação passa a competir com a ligação de hidrogênio entre as próprias moléculas de água. Devido a isso, em sistemas contendo pouca quantidade de etanol pode haver uma redistribuição de água aumentando a agregação por interações eletrostáticas entre as moléculas do soluto, dificultando a solubilidade. Por esse motivo, a solubilidade dos antibióticos apresentou uma redução nos valores na presença de 10% de etanol.

A solubilidade de HPG e PG não apresentou o mesmo comportamento na presença de etanol. Seu valor diminuiu drasticamente (até aproximadamente 86%) devido à redução da constante dielétrica e atividade da água no meio, proveniente da adição de etanol. Comportamento semelhante foi observado por Ferreira *et al.* (2004 e 2008) para cinco aminoácidos.

Gude *et al.* (1996) e Rudolph *et al.* (1999) comentaram que essa diferença no comportamento da solubilidade decorrente da adição de solventes é atribuída à natureza química de suas ligações. Assim, moléculas hidrofílicas mostram um pronunciado efeito *salting out* na presença de solventes orgânicos, em contraste com as moléculas hidrofóbicas.

A maior hidrofobicidade dos antibióticos, comparado a dos subprodutos, foi confirmada por Rudolph *et al.* (1999).

É importante mencionar ainda que nas regiões de pH distante do pI, todos os compostos apresentaram um aumento considerável da solubilidade. Esses resultados concordam com os dados de  $pK_{a1}$  e  $pK_{a2}$  apresentados no capítulo anterior, uma vez que estes aumentaram expressivamente com a presença de etanol em solução favorecendo a predominância de moléculas catiônicas e as interações repulsivas entre suas cargas.

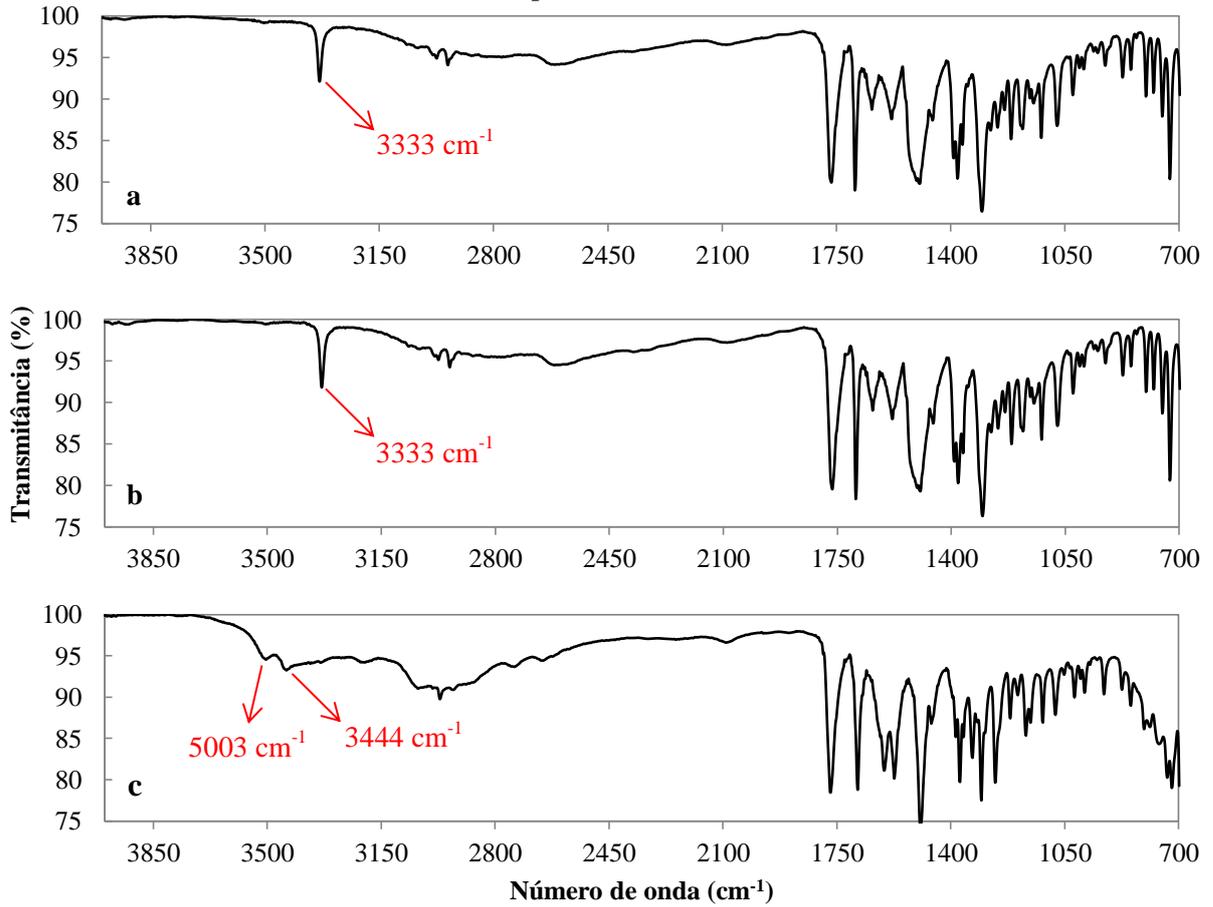
#### 5.5.3.5 Caracterização da fase sólida do equilíbrio sólido-líquido da ampicilina

Como mencionado anteriormente, os resultados de solubilidade da AMP apresentaram um comportamento particular quando comparado com os demais compostos estudados. Observou-se que ao aumentar o pH da solução com adição de solução NaOH, a solubilidade do antibiótico baixou para valores inferiores a solubilidade mínima do seu ponto isoelétrico. Isso pode ser observado localizando os valores de pI apresentados no capítulo anterior nas curvas de solubilidade da AMP.

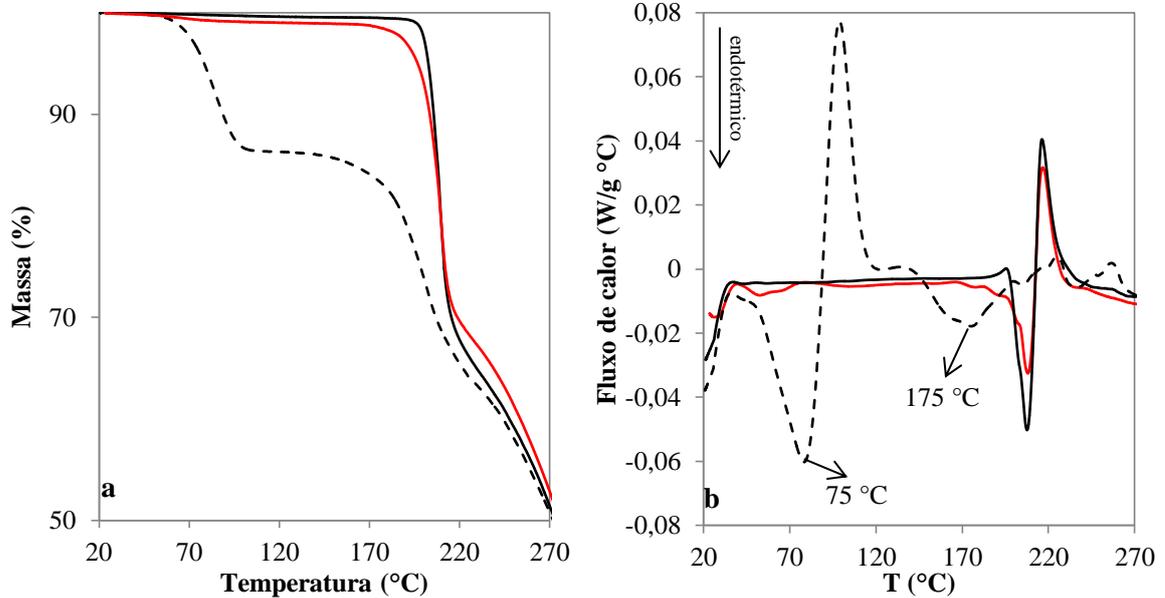
É comum princípios ativos farmacêuticos cristalizarem em mais de uma forma ou estrutura cristalina, ou com moléculas de solventes como parte integral da sua estrutura. A esse fenômeno dá-se o nome de polimorfismo. Essas variações na estrutura cristalina podem causar alterações significativas nas propriedades físico-químicas entre os diferentes polimorfos, tais como dureza, solubilidade, densidade, faixa de fusão, estabilidade, entre outras. A literatura reporta que a ampicilina pode existir em duas formas polimórficas anidras e duas formas hidratadas (mono-hidrato e tri-hidrato), sendo o tri-hidratada a forma mais estável em água pura a temperatura ambiente dentre os polimorfos.

Diante disso, após um dos ensaios de solubilidade da ampicilina em 10% de etanol, a fase sólida remanescente de duas células de equilíbrio, uma submetida à acidulação com HCl e outra submetida a alcalinização com NaOH, foram filtradas e mantidas em geladeira durante 48 h para secagem e prevenção de possível degradação por temperatura. Estes sólidos foram então analisados juntamente com o antibiótico puro através da análise térmica (TG e DSC) e espectroscopia na região do infravermelho (FTIR) para identificar possíveis diferenças polimórficas. As Figuras 5.9 e 5.10 apresentam os resultados obtidos.

**Figura 5.9 – Espectros de FTIR das amostras de ampicilina: (a) ampicilina + HCl, (b) ampicilina pura, (c) ampicilina + NaOH**



**Figura 5.10 – Análise térmica da ampicilina: ampicilina + HCl (linha vermelha), ampicilina pura (linha preta), ampicilina + NaOH (linha pontilhada), (a) TG, (b) DSC**



Os dados de caracterização por espectroscopia de infravermelho e análise térmica mostraram que o contato ácido não provocou nenhuma modificação na forma cristalina da ampicilina. Ambas as amostras de ampicilina (pura e acidulada) apresentaram os mesmos resultados, referentes à forma anidra do antibiótico. Porém, ao submeter o antibiótico ao contato alcalino, as mudanças observadas no espectro de infravermelho, bem como nas curvas termogravimétricas indicam a ocorrência do fenômeno de hidratação do fármaco, convertendo-o no polimorfo tri-hidrato de ampicilina. Os resultados encontrados estão em consonância com os dados da literatura para a forma hidratada (BARALDI *et al.*, 2014).

A Tabela 5.2 traz as principais bandas de absorção na região de infravermelho para a ampicilina pura e tratada com hidróxido de sódio, já que o tratamento ácido não propiciou mudanças perceptíveis no espectro. No intervalo de 4000-2600  $\text{cm}^{-1}$  são encontradas algumas diferenças significativas. Nesta faixa, são esperados alongamentos de O–H e N–H. O pico agudo e intenso em 3333  $\text{cm}^{-1}$  na ampicilina pura é atribuído ao alongamento N–H. O espectro da ampicilina básica mostra picos característicos em 3503 e 3444  $\text{cm}^{-1}$  relacionados a cristalização da água que estabelece ligações de hidrogênio envolvendo N e =O (amida), =O (anel  $\beta$ -lactâmico),  $\text{COO}^-$  e  $\text{NH}_3^+$  (JAMES e HALL, 1968). Além disso, as estruturas cristalinas das formas anidra e de tri-hidrato de ampicilina mostram que as moléculas estão na forma zwitteriônica, devido a presença de bandas características de  $\text{COO}^-$  e  $\text{NH}_3^+$ .

Segundo análises de DRX reportados na literatura as moléculas na forma anidra são mantidas juntas por ligações de H intermoleculares, enquanto na forma de tri-hidratos moléculas de água de cristalização participam em uma rede complexa de ligações de H ligando vários zwitterions (BARALDI *et al.*, 2014).

Com base nos resultados de análise térmica, observa-se que a ampicilina pura e a ácida só apresentaram perdas consideráveis de massa acima de 200 °C. A ampicilina básica, identificada na forma tri-hidratada, mostrou uma significativa etapa endotérmica em 78 °C devido ao processo de desidratação, indicativo da presença de água de cristalização nessa região de temperatura. Esse processo é imediatamente seguido por uma etapa significativamente exotérmica, característica de transição de estrutura cristalina. É suposto que este processo exotérmico esteja relacionado à cristalização da ampicilina em sua forma monohidratada, cuja desidratação total da molécula ocorre em um segundo pico endotérmico a 175 °C.

Um pico endotérmico final é detectado em 208 °C para ambas as estruturas anidras (ampicilina + HCl e ampicilina pura) e 205 °C para a estrutura tri-hidrato causado pela fusão e decomposição do antibiótico. Baraldi *et al.* (2014) relataram temperaturas de fusão iguais a 218 e 216 °C para tais estruturas cristalinas.

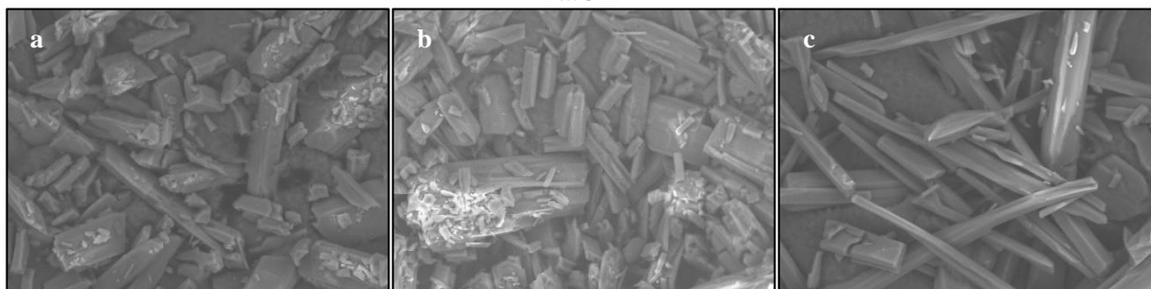
**Tabela 5.2 – Principais bandas de absorção das amostras de ampicilina pura e tratada em meio alcalino**

Ampicilina pura	Ampicilina + NaOH	Atribuição da banda
	3503 e 3444 cm <sup>-1</sup>	Def. axial da lig. O-H de H <sub>2</sub> O (intramoleculares).
3333 cm <sup>-1</sup>		Def. axial da lig. N-H.
2965 e 2930 cm <sup>-1</sup>	2962 cm <sup>-1</sup>	Def. axial da lig. C-H de alifáticos.
	2752 e 2640 cm <sup>-1</sup>	Bandas de combinação do grupo NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> .
1768 cm <sup>-1</sup>	1764 cm <sup>-1</sup>	Def. axial da lig. C=O do anel lactâmico.
1690 cm <sup>-1</sup>	1689 cm <sup>-1</sup>	Def. axial da lig. C=O de amidas secundárias.
1643 cm <sup>-1</sup>		Def. axial do grupo COO <sup>-</sup> .
1587 e 1510 cm <sup>-1</sup>	1600 e 1575 cm <sup>-1</sup>	Def. axial da lig. C-C de aromáticos e def. angular da lig. C-H de aromáticos.
	1498 cm <sup>-1</sup>	Def. axial da lig. C-H de aromáticos, do grupo COO <sup>-</sup> e def. angular do grupo NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> .
1373 cm <sup>-1</sup>	1369 cm <sup>-1</sup>	Def. angular da lig. C-H de alifáticos.
1315 cm <sup>-1</sup>	1330 cm <sup>-1</sup>	Def. axial da lig. C-N de amidas.
	1265 cm <sup>-1</sup>	Def. angular da lig. H-C-N de lactamas e da lig. H-N-C de amidas.
1217 cm <sup>-1</sup>	1215 cm <sup>-1</sup>	Def. angular da lig. H-C-S.
1118 cm <sup>-1</sup>	1114 cm <sup>-1</sup>	Def. angular da lig. C-N do anel lactâmico.
1078 e 923 cm <sup>-1</sup>	1074 cm <sup>-1</sup>	Def. axial da lig. C-N de aminas e vibrações do núcleo aromático.
1020 cm <sup>-1</sup>	1022 cm <sup>-1</sup>	Def. angular da lig. H-N-C de aminas.
	985 cm <sup>-1</sup>	Def. angular da lig. C-C aromáticos.
877 cm <sup>-1</sup>	877 cm <sup>-1</sup>	Def. axial da lig. C-C de alifáticos e def. angular da ligação C-C-S.
746 e 732 cm <sup>-1</sup>	725 cm <sup>-1</sup>	Vibrações do anel lactâmico e def. angulares das ligações N-C-O e C-N-C-O

Fonte: Autor.

Para complementar a caracterização das amostras de ampicilina, foi realizada uma análise da morfologia em um microscópio eletrônico de varredura (MEV). As micrografias obtidas, conforme Figura 5.11, confirmaram a alteração polimórfica a partir da mudança morfológica apresentada pela AMP em meio básico, quando comparada com as demais. O antibiótico na forma tri-hidratado apresentou nitidamente a formação de cristais maiores que a forma anidra.

**Figura 5.11 – Micrografia (1000x) da fase sólida da ampicilina. a) AMP puro, b) AMP + HCl, c) AMP + NaOH**



Fonte: Autor

## 5.6 Considerações parciais

Dispondo dos resultados obtidos na análise experimental do equilíbrio sólido-líquido da amoxicilina, ampicilina e seus subprodutos da reação enzimática, pode-se concluir que a metodologia aplicada neste trabalho para a determinação dos dados de solubilidade se mostrou uma técnica bastante satisfatória, pois reproduziu com confiança os resultados disponíveis na literatura, reduzindo significativamente o tempo gasto para a determinação dos resultados. As curvas de solubilidade experimental apresentaram boa confiabilidade nos resultados, uma vez que o desvio padrão representado pelas barras de erro mostraram-se quase imperceptíveis na maioria dos casos.

O comportamento da solubilidade dos compostos aqui estudados obedeceu aos fundamentos apresentados na literatura, frente às variações de pH, temperatura e composição de etanol. O aumento da temperatura ocasionou solubilidades ligeiramente maiores para todos os compostos. O aumento na composição de etanol reduziu significativamente a solubilidade do HPG e PG. Porém, a solubilidade da AMOX e AMP apresenta efeito inverso à presença de etanol. Este comportamento contrário está relacionado à hidrofobicidade dos compostos, concordando com diversos trabalhos disponíveis na literatura. Com relação à variação de pH, É esperado, em geral, que a curva de solubilidade de compostos deste tipo obedeça a um

comportamento em forma de U. Exceto ampicilina em 0, 10 e 30%, todos os compostos apresentaram solubilidade mínima na região próxima ao ponto isoelétrico, aumentando à medida que a fração de moléculas eletricamente carregadas tornava-se maior.

Essa redução na solubilidade da ampicilina é decorrente da alteração na estrutura cristalina. A ampicilina anidra se transforma na molécula tri-hidratada em adição de NaOH, alterando significativamente as propriedades do antibiótico.

A solubilidade dos compostos estudados em sistemas contendo solventes é uma propriedade principalmente conduzida pelo equilíbrio entre as interações eletrostáticas, hidrofóbicas e polaridade do meio solvente.

Em todas as concentrações de etanol estudadas, a solubilidade da HPG apresentou valores maiores que da AMOX, indicando resultados promissores para a precipitação do antibiótico, exceto em pHs extremos (próximo de 3,0 e 8,0) em misturas contendo 70% em etanol, composição e pH não factível para o processo. O mesmo não foi observado entre AMP e PG. A precipitação da AMP em misturas contendo PG e etanol é viável em baixas concentrações de etanol (menor que 30%).

## CAPÍTULO 6 – MODELAGEM TERMODINÂMICA DOS ANTIBIÓTICOS $\beta$ -LACTÂMICOS E SEUS SUBPRODUTOS

### 6.1 Introdução

O comportamento de fases de sistemas aquosos contendo penicilinas semissintéticas e seus subprodutos até agora foram pouco estudados. Além disso, os modelos termodinâmicos disponíveis não são capazes de descrever adequadamente o comportamento de fases encontrado para estes sistemas (RUDOLPH *et al.*, 1999), uma vez que a presença de íons na cadeia destes compostos torna a modelagem termodinâmica muito mais complexa. Entretanto, uma base de dados experimentais e modelos termodinâmicos confiáveis são ferramentas imprescindíveis para a otimização de processos de separação de biomoléculas, sendo esta operação cada vez mais usada na síntese de antibióticos semissintéticos.

Considerando a semelhança química entre os grupos funcionais dos compostos estudados neste trabalho e os aminoácidos, uma extensa quantidade de trabalhos direcionados na modelagem destes últimos serviu como base para a predição das curvas de solubilidade apresentadas no capítulo anterior.

Franco e Pessoa Filho (2011) propuseram um novo modelo termodinâmico baseado em fundamentos de físico-química básica, relacionando a solubilidade de proteínas com o pH. A fim de aprofundar a discussão da não idealidade desses sistemas, Franco *et al.* (2013) modificaram este modelo incluindo um termo de não-idealidade calculado pelo modelo de Pitzer para soluções eletrolíticas, aplicando-o em sistemas contendo aminoácidos e ampicilina em meio aquoso. Devido à boa capacidade de correlacionar a solubilidade de compostos com características aminoácidas apresentada por estes modelos, os mesmos foram aplicados em conjunto com os dados de equilíbrio químico e de fases obtidos experimentalmente.

### 6.2 Desenvolvimento teórico dos modelos utilizados

Na descrição matemática da curva de solubilidade de sistemas contendo biomoléculas, o aspecto mais importante é a modelagem da fase líquida, já que a fase sólida é constituída unicamente por moléculas de soluto. Do critério de equilíbrio de fases citado no item 4.2, sabe-se que é válida a Equação 6.1,

$$\mu_1^S = \mu_1^L \quad (6.1)$$

onde  $\mu_1^S$  é o potencial químico do soluto na fase sólida e  $\mu_1^L$  é o potencial químico do soluto na fase líquida. Para um processo isotérmico desprezando-se o efeito da pressão, tem-se que o potencial químico da fase sólida é constante, visto que esta fase é composta de um único componente cuja composição é fixa. Assim, o potencial químico do soluto na fase líquida deve permanecer constante, independente dos valores de pH da solução (FRANCO *et al.*, 2013).

Na Equação 6.2, tem-se a expressão do potencial químico da fase líquida em termos da molalidade,

$$\mu_1^L = \mu_1^* + RT \ln \left( \frac{m_1}{m^*} \right) \quad (6.2)$$

onde  $m_1$  é a molalidade do soluto na fase líquida, ou ainda a solubilidade do soluto em termos de molalidade; e  $\mu_1^*$  é o potencial químico de referência do soluto. Este estado de referência é o de uma solução ideal de concentração unitária, isto é, uma solução hipotética na qual o soluto tem uma concentração  $m^* = 1,0$  molal, mas experimenta as mesmas interações que se estivesse em uma solução a diluição infinita (FRANCO, 2012).

Uma vez que o equilíbrio entre as fases sólida e líquida é estabelecido somente entre moléculas eletricamente neutras, em virtude do princípio da eletroneutralidade da fase sólida, a molalidade destas moléculas na fase líquida deve permanecer inalterada com a variação do pH da solução, sendo uma fração da solubilidade do soluto nesta solução, conforme escrita pela Equação 6.3.

$$m_0 = \phi_0(\text{pH}) S(\text{pH}) \quad (6.3)$$

em que  $m_0$  é a molalidade das moléculas eletricamente neutras da fase líquida,  $\phi_0$  é a fração de moléculas de soluto eletricamente neutras da fase líquida e  $S$  é a solubilidade do mesmo na fase líquida. Com isso, a curva de solubilidade de uma dada proteína em função do pH pode ser descrita conforme a Equação 6.4.

$$S(\text{pH}) = \frac{\phi_0(\text{pI})S(\text{pI})}{\phi_0(\text{pH})} \quad (6.4)$$

Baseado nesta equação e considerando o comportamento ideal na fase líquida, Franco e Pessoa Filho (2011) obtiveram a Equação 6.5 a partir do cálculo da fração de moléculas de proteína eletricamente neutras.

$$\log \frac{S(\text{pH})}{S(\text{pI})} = (\text{pI} - \text{pH}) + \log \left( \frac{1 + 10^{\text{pH} - \text{pK}_{a1}}}{1 + 10^{\text{pI} - \text{pK}_{a1}}} \right) + \log \left( \frac{1 + 10^{\text{pH} - \text{pK}_{a2}}}{1 + 10^{\text{pI} - \text{pK}_{a2}}} \right) \quad (6.5)$$

A grande diferença entre a solubilidade no ponto isoelétrico e em outros valores de pH é devido às interações entre moléculas carregadas, interações estas não consideradas pela Equação 6.5. Devido às diferentes formas iônicas possíveis em solução aquosa, em certos sistemas é necessária a consideração da não idealidade da fase líquida. Para isso, Franco *et al.* (2013) utilizaram o modelo de Pitzer modificado por Pessoa Filho e Maurer (2008) para soluções eletrolíticas, o qual considera que o logaritmo natural do coeficiente de atividade é dado pela soma de um termo para interações de longo alcance (LR) e um termo para interações de curto alcance (SR), conforme a Equação 6.6:

$$\ln \gamma_i = \ln \gamma_i^{\text{LR}} + \ln \gamma_i^{\text{SR}} \quad (6.6)$$

com o termo de longo alcance dado por uma extensão do modelo de Debye-Hückel, e o termo de curto alcance escrito em sua formulação para eletrólitos, conforme apresentado por Pessoa Filho e Maurer (2008).

Considerando apenas as moléculas neutras para o cálculo do equilíbrio de fases, em virtude destas apresentarem carga líquida nula, o termo de longo alcance torna-se nulo e apenas o termo de curto alcance entra no cálculo da não idealidade. Além disso, foram consideradas somente interações binárias na tentativa de diminuir os parâmetros ajustáveis, utilizando a equação de Pitzer com o menor número de parâmetros possível, resultando na Equação 6.7,

$$\begin{aligned} \log \frac{S(\text{pH})}{S(\text{pI})} &= (\text{pI} - \text{pH}) + \log \left( \frac{1 + 10^{\text{pH} - \text{pK}_{a1}}}{1 + 10^{\text{pI} - \text{pK}_{a1}}} \right) + \log \left( \frac{1 + 10^{\text{pH} - \text{pK}_{a2}}}{1 + 10^{\text{pI} - \text{pK}_{a2}}} \right) + \dots \\ &\dots + \frac{2}{\ln 10} \lambda [S(\text{pI}) - S(\text{pH})] \end{aligned} \quad (6.7)$$

com  $\lambda$  correspondendo ao parâmetro de interação introduzido pelo modelo de Pitzer em função apenas da temperatura, segundo a Equação 6.8

$$\lambda_{ij}(T) = C_1 + \frac{C_2}{T} \quad (6.8)$$

Dada uma interpretação à não-idealidade do sistema a partir da termodinâmica estatística, foi possível obter a Equação 6.9 que descreve a curva de solubilidade de polieletrólitos considerando as interações intermoleculares na fase líquida.

$$\log \frac{S(\text{pH})}{S(\text{pI})} = (\text{pI} - \text{pH}) + \log \left( \frac{1 + 10^{\text{pH} - \text{pK}_{a1}}}{1 + 10^{\text{pI} - \text{pK}_{a1}}} \right) + \log \left( \frac{1 + 10^{\text{pH} - \text{pK}_{a2}}}{1 + 10^{\text{pI} - \text{pK}_{a2}}} \right) + \dots$$

$$\dots + \frac{4\pi\sigma^3 N_A \rho}{3} \left( 1 - \frac{\varepsilon}{k_B T} \right) [S(\text{pI}) - S(\text{pH})] \quad (6.9)$$

onde  $\sigma$  é o raio de van der Waals médio das moléculas,  $N_A$  é o Número de Avogadro ( $6,0221415 \times 10^{23}$ ),  $\rho$  é o número de moléculas do componente  $j$  por unidade de volume,  $\varepsilon$  é o parâmetro de interação entre as moléculas  $i$  e  $j$  e  $k_B$  a constante de Boltzmann ( $1,3806503 \times 10^{-23} \text{ m}^2 \text{ kg s}^{-2} \text{ K}^{-1}$ ).

Segundo Franco (2012), essa abordagem é necessária, pois torna a aplicação do modelo mais consistente a partir da comparação entre as Equações 6.5 e 6.9, além das constantes de ajuste do parâmetro de interação do modelo de Pitzer apresentadas ganharem significado físico mais forte, conforme as Equações 6.10 e 6.11.

$$C_1 = \frac{2\pi\sigma^3 N_A \rho}{3} \quad (6.10)$$

$$C_2 = -C_1 \frac{\varepsilon}{k_B T} \quad (6.11)$$

É importante mencionar que em ambas as abordagens, a expressão algébrica estima a solubilidade de um composto  $\beta$ -lactâmico em função do pH partindo de um ponto de referência, sendo este o ponto isoelétrico.

No presente trabalho foram aplicados ambos os modelos descritos pelas Equações 6.5 e 6.9, contemplando o comportamento ideal e não ideal da fase líquida, respectivamente, para a descrição da curva de solubilidade da amoxicilina, ampicilina e seus subprodutos na síntese enzimática. Os valores calculados foram comparados com os dados experimentais apresentados no capítulo anterior.

### 6.3 Resultados e discussão

A disponibilidade de dados experimentais é essencial para o bom desenvolvimento e avaliação dos diferentes modelos termodinâmicos. Diante da quantidade de dados experimentais apresentados nos capítulos anteriores, a avaliação de modelos termodinâmicos tornou-se viável para contribuir na elucidação do comportamento de fases da amoxicilina, ampicilina e seus subprodutos em diferentes condições operacionais. Assim, a capacidade de correlação das Equações 6.5 e 6.9 foi investigada usando os dados de solubilidade e constantes de dissociação experimentais obtidos.

Nestes modelos, a solubilidade no ponto isoelétrico foi considerada como sendo o resultado experimental dos ensaios em que não houve a correção de pH por adição de HCl ou NaOH. Os valores de  $pK_a$  usados nos cálculos foram os apresentados no Capítulo 4. Além disso, embora a AMOX apresente um terceiro grupo ionizável decorrente do  $-OH$ , o efeito de tal ionização na solubilidade do antibiótico foi desprezada. Devido ao elevado caráter básico deste grupo, os resultados da solubilidade considerando a contribuição dos três grupos ionizados e as equações truncadas até o segundo grupo ionizável não apresentaram diferenças significativas.

Para o cálculo da solubilidade a partir da abordagem não ideal, utilizou-se o programa de ajuste de parâmetros ao conjunto de dados experimentais fornecido por Franco (2012), que o fez através da minimização da função definida pela Equação 6.12 (FRANCO *et al.*, 2013) com duas variáveis a serem ajustadas ( $C_1$  e  $C_2$ ).

$$GRMSD = \sqrt{\frac{1}{M} \sum_j \left[ \frac{1}{N_j} \sum_{i=1}^{N_j} \left( \frac{S_{ij}^{exp} - S_{ij}^{calc}}{S_{ij}^{exp}} \right)^2 \right]} \quad (6.12)$$

em que  $M$  é número total de conjuntos de dados,  $N$  é o conjunto de dados experimentais a uma dada temperatura,  $S_{ij}^{exp}$  e  $S_{ij}^{calc}$  referem-se respectivamente a solubilidade medida e calculada a um dado valor de pH e temperatura. Segundo os autores, esse critério quantitativo atribui menores pesos a valores de solubilidade absolutos maiores, normalizando os desvios. Os parâmetros foram ajustados para cada composto e composição diferente de água + etanol, cujos resultados encontram-se a Tabela 6.1.

**Tabela 6.1** – Valores dos parâmetros ajustados e GRMSD

Composto	$w'_2$	$\sigma$ (Å)	$\epsilon/k_B$ (K)	GRMSD
AMOX	0,30	4,26	299,01	9,0 %
	0,70	2,94	334,42	19,5%
AMP	0,00	3,91	251,28	13,7%
	0,70	2,60	281,39	11,9%
PG	0,30	3,03	254,28	0,8 %

Fonte: Autor

Conforme observado na tabela anterior, poucos sistemas apresentaram parâmetros ajustáveis. Porém, estes exibiram uma tendência nos valores de  $\sigma$  tal que  $AMOX > AMP >$

PG, coerente com o esperado conforme a estrutura molecular dos compostos. Além disso, o parâmetro  $\epsilon$  aumentou com a composição de etanol, indicando um incremento nas interações hidrofóbicas entre as moléculas.

Para os sistemas contendo AMP em 10 e 30 % de etanol, os parâmetros não convergiram para valores que resultassem em  $\sigma$  e  $\epsilon$  fisicamente aceitáveis. Devido a mudança na composição da fase sólida da AMP na região de pH alcalino, mencionado no capítulo anterior, o modelo não foi capaz de ajustar um valor ótimo do par  $C_1$ – $C_2$  para a descrição dos dados experimentais da solubilidade. Nos demais sistemas estudados que não constam na Tabela 6.1, a função de ajuste dos parâmetros encontrou seu ótimo em valores de  $C_1$  ou  $C_2$  igual a zero. Pela Equação 6.11, entende-se que quando um dos parâmetros é zero, o segundo também o é. Logo, a Equação 6.9 é simplificada à Equação 6.5. Isso significa que a abordagem não ideal estima que o menor desvio obtido na correlação dos dados experimentais é obtido considerando a abordagem ideal.

Os gráficos obtidos na correlação entre os dados experimentais e a solubilidade calculada por ambos os modelos estão apresentados no Apêndice E, para todos os compostos, temperatura e composição de etanol. A validade dos modelos utilizados foi determinada através do desvio quadrado médio relativo (RMSD) utilizando a Equação 6.13 para cada condição de temperatura e teor de etanol estudado. A Equação 6.12 também foi usada para avaliar globalmente a eficiência dos modelos na correlação dos dados experimentais, considerando os dados de todas as temperaturas.

$$\text{RMSD} = \sqrt{\frac{1}{N} \sum \left( \frac{S^{\text{exp}} - S^{\text{cal}}}{S^{\text{exp}}} \right)^2} \quad (6.13)$$

Baseado nos desvios obtidos, conforme apresentado na Tabela 6.2, observa-se que o modelo proposto por Franco *et al.* (2013) não apresentou melhoria significativa do desvio global na correlação dos dados de solubilidade dos compostos estudados. Esse argumento é confirmando ao observar as Figuras E.1 à E.16, onde as curvas de solubilidade não ideal se localizam bem próximas, em alguns casos totalmente sobrepostas, às de solubilidade ideal. Neste caso, deve-se levar em consideração a necessidade de optar por um modelo com parâmetros estimados ou não.

Devido ao polimorfismo exibido pela molécula da ampicilina, a fase sólida apresentou uma variação na sua composição ao longo da curva, partindo de uma molécula anidra em meio ácido para uma molécula tri-hidratada em meio alcalino. Essa mudança na composição da fase sólida contraria o critério de equilíbrio sólido-líquido considerado na obtenção das

equações, de que esta fase é composta de moléculas neutras com composição constante ( $\mu_1^S =$  constante). A dificuldade dos modelos se ajustarem aos dados experimentais de solubilidade da ampicilina em água pura é decorrente desse mesmo fenômeno. Por isso, elevados valores de RMSD e GRMSD foram obtidos para a ampicilina nas composições de 0 à 30% de etanol em algumas temperaturas. É importante ressaltar que os valores de  $pK_a$  obtidos concordaram com a estrutura anidra do antibiótico, devido as boas correlações encontradas na região ácida, salvo algumas exceções.

Segundo Franco *et al.* (2013), valores de  $\epsilon/k_B$  maior que a temperatura do conjunto de dados experimentais fornecem coeficientes de atividade menor que 1, resultando em um desvio da idealidade negativo. Os resultados obtidos seguiram esta tendência, podendo ser conferida pela mudança na posição da curva não ideal comparada a curva ideal entre os dados de AMOX (desvio negativo) e demais compostos (desvio positivo).

Os desvios oriundos da correlação das curvas de solubilidade dos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos são consideravelmente maiores que os desvios obtidos na correção dos respectivos subprodutos. Este comportamento é esperado, já que o desvio da idealidade aumenta com o aumento da massa molecular, e está diretamente ligada ao aumento do efeito de “volume excluído” (Franco, 2012). Além disso, como se sabe a partir de livros-texto, soluções água+etanol apresentam grande desvio da idealidade para altas concentrações deste último. Por isso, em todos os compostos é possível observar um aumento nos desvios em concentrações maiores de etanol.

É possível afirmar que a aplicação do modelo ideal proposto por Franco e Pessoa Filho (2011) é uma abordagem conveniente no tratamento termodinâmico do equilíbrio sólido-líquido dos sistemas estudados, em especial à hidroxifenilglicina e fenilglicina, em virtude da boa correlação obtida para todos os compostos estudados, exceto nos casos de polimorfismo. Deve-se notar, entretanto que a validade do modelo é restrita à região próxima ao ponto isoelétrico; já que para valores de pH distantes deste ponto a curva de fração de moléculas neutras tende a zero, resultando pela Equação 6.4 em uma solubilidade infinita que é fisicamente inaceitável.

Tabela 6.2 – Valores de desvio médio absoluto e relativo entre os modelos aplicados e os dados experimentais de solubilidade dos compostos estudados a diferentes temperaturas e composição de etanol

Composto	$w_2'$	25 °C		20 °C		15 °C		10 °C		GRMSD <sup>A</sup> (%)	GRMSD <sup>B</sup> (%)
		RMSD <sup>A</sup> (%)	RMSD <sup>B</sup> (%)								
AMOX	0	11,9	-	6,5	-	8,9	-	9,6	-	9,4	-
	0,1	13,0	-	5,9	-	5,0	-	6,7	-	8,7	-
	0,3	5,7	5,7	4,3	2,7	12,8	8,5	15,7	13,9	10,6	8,6
	0,5	8,8	-	5,3	-	8,7	-	10,3	-	8,5	--
	0,7	20,7	20,4	13,7	11,1	17,9	17,2	25,5	23,5	39,8	37,2
AMP	0	19,9	17,6	20,7	13,1	6,7	10,3	4,6	5,4	15,2	12,4
	0,1	62,7	-	32,4	-	16,2	-	9,3	-	36,5	-
	0,3	8,5	-	43,6	-	54,7	-	64,5	-	47,8	-
	0,5	7,7	-	5,6	-	4,2	-	5,0	-	5,8	-
	0,7	16,8	16,6	9,8	9,8	13,8	13,9	8,8	8,1	12,7	12,5
HPG	0	0,9	-	0,6	-	1,8	-	0,6	-	1,1	-
	0,1	2,1	-	0,8	-	3,4	-	0,5	-	2,0	-
	0,3	2,8	-	2,7	-	1,1	-	1,2	-	2,1	-
	0,5	2,1	-	2,0	-	4,1	-	2,2	-	2,8	-
	0,7	6,0	-	10,5	-	12,3	-	3,6	-	8,8	-
PG	0	0,4	-	0,2	-	1,4	-	1,5	-	1,0	-
	0,1	0,6	-	0,5	-	0,8	-	1,3	-	0,9	-
	0,3	1,0	0,8	0,8	0,6	1,5	0,9	0,8	0,9	1,1	0,8
	0,5	1,8	-	0,8	-	1,3	-	2,1	-	1,6	-
	0,7	3,6	-	5,1	-	6,9	-	2,8	-	4,9	-

<sup>A</sup> Modelo ideal, <sup>B</sup> Modelo não ideal. Fonte: Autor

#### 6.4 Considerações parciais

Diante do que foram desenvolvidas neste trabalho, algumas informações a respeito da modelagem termodinâmica podem ser destacadas:

Os modelos propostos por Franco e Pessoa Filho (2011) e Franco *et al.* (2013) foram capazes de descrever quantitativamente as curvas de solubilidade dos compostos subprodutos da reação enzimática da amoxicilina e ampicilina em diferentes temperaturas e composição de etanol. A baixa correlação das equações com a solubilidade da ampicilina até 30% é devido a mudança no comportamento desta propriedade decorrente da alteração polimórfica do antibiótico. Nestes sistemas, uma combinação de diferentes equações ao longo da curva de solubilidade é uma alternativa para uma correlação dos diferentes potenciais químicos. Entretanto, os modelos descreveram com êxito a solubilidade da ampicilina em maiores condições de etanol, além da amoxicilina em até 50% de etanol, apresentando desvios comparáveis aos de Franco Franco *et al.* (2013) para proteínas. A não idealidade da amoxicilina apresentada a 70% de etanol é acentuada devido à presença dos diversos grupos funcionais ionizáveis em adição ao aumento das interações hidrofóbicas entre eles e com o solvente.

A boa representação matemática da solubilidade dos compostos estudados a partir dos modelos apresentados significa que os dados experimentais obtidos estão de acordo com os fenômenos físico-químicos que fundamentam estas equações.

Apesar da vasta literatura dedicada à modelagem da não-idealidade de soluções contendo moléculas com características aminoácidas, em muitos casos a consideração de solução ideal é suficiente para uma descrição razoavelmente precisa da curva de solubilidade destes compostos, trazendo a vantagem de não necessitar de ajuste de parâmetros.

A maior dificuldade em correlacionar os dados experimentais com os modelos utilizados neste trabalho é encontrada no conhecimento de dados de  $pK_a$  confiáveis e em uma ampla faixa de condições operacionais, já que a natureza das equações mostram a forte influência destas propriedades na solubilidade.

## CAPÍTULO 7 – CONCLUSÕES

Depois da apresentação dos estudos desenvolvidos, é válido destacar alguns pontos fundamentais deste trabalho.

Os valores de  $pK_a$  obtidos experimentalmente apresentaram boa concordância com os resultados apresentados na literatura em água pura, para todos os compostos estudados. A negligência do efeito iônico sobre estas propriedades pareceu ser uma simplificação razoável, uma vez que os modelos termodinâmicos apresentam boas correlações com os dados de solubilidade quando utilizados estas constantes de dissociação.

A partir de uma análise dos parâmetros termodinâmicos das reações de dissociação dos compostos, as dissociações dos grupos ionizáveis tende para as espécies protonadas. Todas as reações envolvidas no equilíbrio químico mostraram ser endotérmicas, com exceção da desprotonação do grupo carboxílico dos antibióticos, indicando que estes são conduzidos predominantemente pelas variações entrópicas.

A coerência do efeito da temperatura sobre os valores de  $pK_a$  é confirmada pela correlação linear entre os dados experimentais e a temperatura, obedecendo aos fundamentos da equação da Van't Hoff.

Dentre as variáveis estudadas, a temperatura foi a que menos influenciou nos dados de solubilidade dos compostos. Esse mesmo comportamento também é relatado por diversos autores na literatura. Argumentos baseados em suposições entre os diferentes autores indicam a necessidade de uma análise mais específica da entalpia e entropia de fusão destes compostos, permitindo entender o efeito da temperatura sobre estes compostos.

O comportamento das curvas de solubilidade frente às variações na concentração de etanol estão condizentes com a variação de  $pK_{a1}$  e  $pK_{a2}$  nestas mesmas variações. Conforme observado no capítulo 4, a presença do etanol provoca um estreitamento na região onde ocorre a predominância de moléculas zwitteriônicas. Em vista disso, na faixa de pH estudada as curvas de solubilidade apresentam curvaturas mais acentuadas, decorrente da presença de cargas elétricas na maior parte dos valores de pH.

As análises TG, DSC, FTIR e MEV permitiram identificar a característica polimorfa da ampicilina, sendo evidenciada em soluções alcalinas contendo baixa ou nenhuma concentração de etanol. A mudança na sua estrutura cristalina causa variações significativas nas propriedades do antibiótico.

Os modelos termodinâmicos utilizados apresentaram boa representação das curvas experimentais, exceto quando há a presença de diferentes estruturas cristalinas. Por vezes, a abordagem ideal descreve com precisão as curvas de solubilidade da hidroxifenilglicina e fenilglicina em todas as condições de temperatura e composição de etanol estudado. No entanto, uma previsão satisfatória foi alcançada do comportamento da amoxicilina até 50% de etanol, e da ampicilina até 70%, obtendo desvios comparáveis aos sistemas contendo aminoácidos e proteínas reportados na literatura. Os maiores desvios adquiridos na correlação das curvas de solubilidade de todos os compostos em 70% de etanol pode ser explicado pelo afastamento do comportamento de solução ideal da mistura de solventes aliado ao erro da negligência da força iônica na determinação de  $pK_a$ .

Ainda assim, pode-se afirmar que nem sempre o uso de modelos complicados para descrever a não idealidade de sistemas, tais como os estudados neste trabalho, é o mais indicado.

Esta tese apresentou uma grande quantidade de novos dados de equilíbrio químico e de fases da amoxicilina, ampicilina e seus subprodutos da síntese enzimática, em uma ampla faixa de condições operacionais. Estes resultados contribuem imensamente para trabalhos futuros de projeto e simulação da síntese enzimática da amoxicilina e ampicilina, visando a otimização e viabilidade desta rota.

## SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Investigar o efeito da força iônica nas constantes de dissociação;
- Avaliar o efeito cossoluto entre os diferentes componentes, a partir de sistemas multicomponentes;
- Elucidar as condições que favorecem o polimorfismo da ampicilina;
- Ampliar a faixa de pH na investigação do equilíbrio de fases das diferentes estruturas cristalinas da ampicilina;
- Realizar medidas de DRX com intuito de complementar as investigações de caracterização;
- Aplicar a abordagem SAFT na descrição da solubilidade da amoxicilina e ampicilina, tendo em vista a ampla aplicabilidade deste modelo em sistemas contendo proteínas e amoniácidos.

## REFERÊNCIAS

- ABIQUIFI, Associação Brasileira da Indústria Farmoquímica e de Insumos Farmacêuticos. Rio de Janeiro. Disponível em <[www.abiquifi.org.br](http://www.abiquifi.org.br)>. Acessado em 09 de Abril de 2016.
- AliceWeb – Secretaria de Comércio Exterior. Brasília. Disponível em: <<http://aliceweb.desenvolvimento.gov.br/>>. Acessado em 09 de Abril de 2016.
- AGUIAR, R. S. S. **Modelagem Termodinâmica do Equilíbrio Líquido-Líquido em Sistemas envolvendo Líquidos Iônicos com Modelos de Composição Local/Contribuição de Grupo e Estruturas Moleculares Determinadas via Química Quântica**. 203 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química). Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2009.
- AGUIRRE, C.; TOLEDO, M.; MEDINA, V.; ILLANES, A. **Effect of cosolvent and pH on the kinetically controlled synthesis of cephalosporin with immobilized penicillin acylase**. *Process Biochemistry*, v. 38, p. 351–360, 2002.
- ALEKSEEV, V.G.; DEMSKAYA, E.V.; DODONOVA, M. S. **Thermodynamic constants of acid-base equilibria in solutions of penicillins**. *Russian Journal of General Chemistry*, v. 75, p. 993–998, 2005.
- ARAKAWA, T.; TIMASHEFF, S. N. **Theory of protein solubility**. *Methods Enzymol*, v. 114, p. 49–77, 1985.
- BARALDI, C.; TINTI, A.; OTTANI, S.; GAMBERINI, M.C. Characterization of polymorphic ampicillin forms. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 100, p. 329–340, 2014.
- BARKER, J. A.; HENDERSON, D. **Perturbation theory and equation of state for fluids: the square-well potential**. *The Journal of Chemical Physics*, v. 47, p. 2856–2861, 1967.
- BEZERRA, I. M.; CHIAVONE-FILHO, O.; MATTEDI, S. **Solid-liquid equilibrium data of amoxicillin and hydroxyphenylglycine in aqueous media**. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, v. 30, p. 45–54, 2013.
- BROWN, M.G.; ROUSSEAU, R.W. **Effect of Sodium Hydroxide on the Solubilities of L-isoleucine, L-leucine and L-valine**. *Biotechnology Progress*, v. 10, p. 253–257, 1994
- CAMERETTI, L.F.; SADOWSKI, G. **Modeling of aqueous amino acid and polypeptide solutions with PC-SAFT**. *Chemical Engineering and Processing*, v. 47, p. 1018–1025, 2008.
- CANTU, M.D., HILLEBRANDA, S.; CARRILHO, E. **Determination of the dissociation constants ( $pK_a$ ) of secondary and tertiary amines in organic media by capillary electrophoresis and their role in the electrophoretic mobility order inversion**. *Journal of Chromatography A*, v. 1068, p. 99-105, 2005.
- CARTA, R., **Solubilities of L-cystine, L-tyrosine, L-leucine and glycine in sodium chloride solutions at various pH values**. *The Journal of Chemical Thermodynamics*, v. 30, p. 379–387, 1998.

- CHAPMAN, W. G.; GUBBINS, K. E.; KACKSON, G.; RADOSZ, M. **New reference equation of state for associating liquids**. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, v. 29, p. 1709–1721, 1990.
- CHEN, C.C.; ZHU, Y.; EVANS, L. B. **Phase partitioning of biomolecules: solubilities of aminoacids**, *Biotechnol Progress*, v. 5, p. 111-118, 1989.
- CHRISTOPHER, G. K.; PHIPPS, A. G.; GRAY, R. J. **Temperature-dependent solubility of selected proteins**. *Journal of Crystal Growth*, v. 191, p. 820–826, 1998.
- COUTINHO, J. A. P.; PESSOA, F. L. P. **Extending the extended UNIQUAC to proteins**. *Fluid Phase Equilibria*, v. 222–223, p. 127–133, 2004.
- CREA, F.; CUCINOTTA, D.; STEFANO, C. DE; MILEA, D.; SAMMARTANO, S.; VIANELLI, G. **Modeling solubility, acid–base properties and activity coefficients of amoxicillin, ampicillin and (+)6-aminopenicillanic acid, in NaCl(aq) at different ionic strengths and temperatures**. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 47, p. 661–677, 2012.
- DALDRUP, J.G.; HELD, C.; RUETHER, F.; SCHEMBECKER, G.; SADOWSKI, G. **Measurement and modeling solubility of aqueous multisolite amino-acid solutions**. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, v. 49, p. 1395–1401, 2010.
- DEMIRALAY, E. Ç.; KOÇ, D.; DALDAL, Y. D.; ÇAKIR, C. **Determination of chromatographic and spectrophotometric dissociation constants of some beta lactam antibiotics**. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 71, p. 139–143, 2012.
- DIENDER, M. B.; STRAATHOF, A. J. J.; VAN DER WIELEN, L. A. M.; RAS, C.; HEIJNEN, J. J. **Feasibility of the thermodynamically controlled synthesis of amoxicillin**. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 5, p. 249–253, 1998.
- DOMANSKA, U.; POBUDKOWSKA, A.; PELCZARSKA, A.; ZUKOWSKI, Ł. **Modelling, solubility and  $pK_a$  of five sparingly soluble drugs**. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 403, p. 115–122, 2011.
- DUTTA, M.; DUTTA, N. N.; BHATTACHARYA, K. G. **Aqueous phase adsorption of certain beta-lactam antibiotics onto polymeric resins and activated carbon**. *Separation and Purification Technology*, v. 16, p. 213 – 224, 1999.
- EHALA, S.; GRISHINA, A.A.; SHESHENEV, A.E.; LYAPKALO, I.M.; KAŠIČKA, V. **Determination of acid–base dissociation constants of very weak zwitterionic heterocyclic bases by capillary zone electrophoresis**. *Journal of Chromatography A*, v. 1217, p. 8048–8053, 2010.
- FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; ROSELL, C. M.; GUIŚÁN, J. M. **Enzyme reaction engineering: synthesis of antibiotics catalysed by stabilized penicillin G acylase in the presence of organic cosolvents**. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 13, p. 898–905, 1991.

- FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R.; ROSELL, C. M.; PIATKOWSKA, B.; GUISÁN, J. M. **Synthesis of antibiotics (cephaloglycin) catalyzed by penicillin G acylase: Evaluation and optimization of different synthetic approaches.** *Enzyme and Microbial Technology*, v. 19, p. 9–14, 1996.
- FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R.; ROSELL, C. M.; GUISAN, J. M. **Modulation of the properties of penicillin G acylase by acyl donor substrates during N-protection of amino compounds.** *Enzyme and Microbial Technology*, v. 22, p. 583–587, 1998.
- FERREIRA, A. L. O. **Síntese enzimática da ampicilina em reator integrado.** 213f. Tese (Doutorado em Engenharia Química). Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2004.
- FERREIRA, L. A.; MACEDO, E. A.; PINHO, S. P. **Solubility of amino acids and diglycine in aqueous-alkanol solutions.** *Chemical Engineering Science*, v. 59, p. 3117–3124, 2004.
- FERREIRA, L. A.; MACEDO, E. A.; PINHO, S. P. **KCl effect on the solubility of five different amino acids in water.** *Fluid Phase Equilibria*, v. 255, p. 131–137, 2007.
- FERREIRA, L. A.; MACEDO, E. A.; PINHO, S. P. **Solubility of L-serine, L-threonine and L-isoleucine in aqueous aliphatic alcohol solutions.** *Fluid Phase Equilibria*, v. 270, p. 1–9, 2008.
- FERREIRA, L.A.R.F. **Separation and purification of amino acids.** 226f. Tese (Doutorado em Engenharia Química). Universidade do Porto, Portugal, 2008.
- FORTE, A.; MELO, C.I.; BOGEL-ŁUKASIK, R.; BOGEL-ŁUKASIK E. **A favorable solubility of isoniazid, an antitubercular antibiotic drug, in alternative solvents.** *Fluid Phase Equilibria*, v. 318, p. 89–95, 2012.
- FRANCO, L. F. M.; PESSÔA FILHO, P. A. **On the solubility of proteins as a function of pH: Mathematical development and application.** *Fluid Phase Equilibria*, v. 25, p. 242–250, 2011.
- FRANCO, L. F. M. **Estudo do equilíbrio sólido-líquido de sistemas contendo aminoácidos e proteínas.** 126f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Universidade de São Paulo. São Paulo, 2012.
- FRANCO, L. F. M.; MATTEDI, S.; PESSOA FILHO, P. A. **A new approach for the thermodynamic modeling of the solubility of amino acids and  $\beta$ -lactam compounds as a function of pH.** *Fluid Phase Equilibria*, v. 354, p. 38–46, 2013.
- FUCHS, D.; FISCHER, J.; TUMAKAKA, F.; SADOWSKI, G. **Solubility of amino acids: influence of the pH value and the addition of alcoholic cosolvents on aqueous solubility.** *Industrial & Engineering Chemistry Research*, v. 45, p. 6578–6584, 2006.
- GANDHI, P.J.; MURTHY, Z.V.P. **Measurement of solubility of mitomycin C in ethanol-water solutions at different temperatures.** *Thermochimica Acta*, v. 545, p. 163 – 173, 2012.

- GIORDANO, R. C.; RIBEIRO, M. P. A.; GIORDANO, R. L. C. **Kinetics of  $\beta$ -lactam antibiotics synthesis by penicillin G acylase (PGA) from the viewpoint of the industrial enzymatic reactor optimization.** *Biotechnology Advances*, v. 24, p. 27–41, 2006.
- GONÇALVES, L. R. B.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R.; GUISÁN, J. M.; GIORDANO, R. L. C. **A kinetic study of synthesis of amoxicillin using Penicillin G Acylase immobilized on agarose.** *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 84–86, p. 931–945, 2000.
- GOODMAN & GILMAN. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica.** 10<sup>a</sup> Ed. Rio de Janeiro, Mc Graw Hill, 2003.
- GRANBERG, R. A.; RASMUSON, A. C. **Solubility of Paracetamol in Pure Solvents.** *Journal of Chemical & Engineering Data*, v. 44, p. 1391–1395, 1999.
- GROSS, J.; SADOWSKI, G. **Perturbed-Chain SAFT: an equation of state based on a perturbation theory for chain molecules.** *Industrial & Engineering Chemistry Research*, v. 40, p. 1244–1260, 2001.
- GUIMARÃES, D. O.; MOMESSO, L. S.; PUPO, M. T. **Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes.** *Química Nova*, v. 33, n<sup>o</sup> 3, p. 667–679, 2010.
- GUDE, M. T.; MEUWISSEN, H. H. J.; VAN DER WIELEN, L. A. M.; LUYBEN, K. CH. A. M. **Partition coefficients and solubilities of  $\alpha$ -amino acids in aqueous 1-butanol solutions.** *Industrial & Engineering Chemistry Research*, v. 35, p. 4700–4712, 1996.
- GUPTA, R. B.; HEIDEMANN, R. A. **Solubility models for amino acids and antibiotics.** *AIChE Journal*, v. 36, p. 333–341, 1990.
- GUTZ, I.G.R. Programa CurTiPot - pH e Curvas de Titulação Potenciométrica: Análise e Simulação, versão 4.2. Disponível em <<http://www.iq.usp.br/gutz/Curtipot.html>>. Acessado em 26 de Dezembro de 2015.
- HELD, C.; CAMERETTI, L.F.; SADOWSKI G. **Measuring and Modeling Activity Coefficients in Aqueous Amino-Acid Solutions.** *Industrial & Engineering Chemistry Research*, v. 50, p. 131–141, 2011.
- HELD, C.; RESCHKE, T.; MÜLLER, R.; KUNZ, W.; SADOWSKI, G. **Measuring and modeling aqueous electrolyte/amino-acid solutions with ePC-SAFT.** *The Journal of Chemical Thermodynamics*, v. 68, p. 1–12, 2014.
- HERHUT, M.; BRANDENBUSCH, C.; SADOWSKI G. **Modeling and prediction of protein solubility using the second osmotic virial coefficient.** *Fluid Phase Equilibria*, manuscript accept, 2016.
- HERNANDEZ-JUSTIZ, O.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R.; TERRENI, M.; GUISAN, J. M. **Use of aqueous two-phase systems for in situ extraction of water soluble antibiotics during their synthesis by enzymes immobilized on porous supports.** *Biothecnology and Bioengineering*, v. 59, p. 73–79, 1998.

- HERNANDEZ-JÚSTIZ, O.; TERRENI, M.; PAGANI, G.; GARCÍA, J. L.; GUISÁN, J. M.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R. **Evaluation of different enzymes as catalysts for the production of  $\beta$ -lactam antibiotics following a kinetically controlled strategy.** *Enzyme and Microbial Technology*, v. 2, p.336–343, 1999.
- HILAL, S.H.; KARICKHOFF, S.W.; CARREIRA, L.A. **Estimation of microscopic, zwitterionic ionization constants, isoelectric point and molecular speciation of organic compounds.** *Talanta*, v. 50, p. 827–840, 1999.
- HOU, J.P., POOLE, J.W. **The amino acid nature of ampicillin and related penicillins.** *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 58, p. 1510–1515, 1969
- ILLANES, A.; FAJARDO, A. **Kinetically controlled synthesis of ampicillin with immobilized penicillin acylase in the presence of organic cosolvents.** *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 11, p. 587–595, 2001.
- ILLANES, A.; ANJARI, S.; ARRIETA, R.; AGUIRRE, C. **Optimization of yields in kinetically controlled synthesis of ampicillin with immobilized penicillin acylase in organic media.** *Applied Biochemistry and Biotechnology* v. 97, p. 165–179, 2002.
- JAMES, M.N.G.; HALL, D. **Crystalline modifications of ampicillin I: the trihydrate.** *Nature*, v. 220, p. 168–170, 1968.
- Jl, P.; ZOU, J.; FENG, W. **Effect of alcohol on the solubility of amino acid in water.** *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 56, p. 185–188, 2009.
- KAKALIS, L. T.; REGENSTEIN, J. M. **Effect of pH and salts on the solubility of egg white protein.** *Journal of Food Science*, v. 51, p. 1445–1455, 1986.
- KHOSHKBARCHI, M. K.; VERA, J. H. **A simplified perturbed hard-sphere model for the activity coefficients of amino acids and peptides in aqueous solutions.** *Industrial & Engineering Chemistry Research*, v. 35,p. 4319 – 4327, 1996.
- KIM, G. K.; LEE, S. B. **Penicillim acylase-catalized synthesis of beta lactam antibiotics in water-methanol mixtures: effect of cosolvents content and chemical nature on reaction rates and yields.** *Journal of molecular Catalysis B: Enzimatic*, v.1, p. 201-211, 1996.
- KLEINER, M.; TUMAKAKA, F.; SADOWSKI, G. **Thermodynamic modeling of complex systems.** *Mocelular thermodynamics of complex systems. Struture and Bonding*, v. 131, p. 75–108, 2009.
- KOROLKOVAS A.; BURCKHALTER J. H. **Química Farmacêutica.** Rio de Janeiro: Guanabara Dois, 1982.
- KUROCHKINA, V.B.; NYS, P.S. **Enzymatic synthesis of aminobeta-lactams. Physicochemical bases of down-stream processes.** *Pharmaceutical Chemistry Journal*, v. 37, p. 655–662, 2003.
- KUROCHKINA, V.B.; SKLYARENKO, A.V.; SATAROVA, J.E.; YAROTSKY, S. V. **Ionization constants and solubility of compounds involved in enzymatic synthesis of**

- aminopenicillins and aminocephalosporins.** *Bioprocess and Biosystems Engineering*, v. 34, p. 1103–1117, 2011.
- LEE, C.; CHEN, J.; CHANG, W.; SHIAH I. **Effect of pH on the solubilities of divalent and trivalent amino acids in water at 298.15 K.** *Fluid Phase Equilibria*, v. 343, p. 30–35, 2013.
- LEITE, G. A. **Síntese enzimática de ampicilina com diferentes substratos em reator integrado.** 158f. Tese (Doutorado em Engenharia Química). Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2009.
- LEHNINGER, A. L. **Princípios de Bioquímica.** 3ª Ed. São Paulo, Editora Sarvier, 2002.
- LIU, J.; LU, J.; LI, Y. **Study on the activity coefficients and the solubilities of amino acids in water by the perturbation theory.** *Fluid Phase Equilibria*, v. 142, p. 67–82, 1998.
- MANIC, M. S.; NAJDANOVIC-VISAK, V. **Solubility of erythromycin in ionic liquids.** *The Journal of Chemical Thermodynamics*, v. 44, p. 102–106, 2012.
- MARTELL, A.E., SMITH, R.M. **Critical Stability Constants.** P. Press, New York, 1997
- MELOUN, M.; BORDOVSKÁ, S.; VRÁNA, A. **The thermodynamic dissociation constants of the anticancer drugs camptothecine, 7-ethyl-10-hydroxycamptothecine, 10-hydroxycamptothecine and 7-ethylcamptothecine by the least-squares nonlinear regression of multiwavelength spectrophotometric pH-titration data.** *Analytica Chimica Acta*, v. 584, p. 419–432, 2007.
- MELOUN, M.; FERENCÍKOVÁ, Z.; VRÁNA, A. **Determination of the thermodynamic dissociation constant of capecitabine using spectrophotometric and potentiometric titration data.** *The Journal of Chemical Thermodynamics*, v. 43, p. 930–937, 2011.
- MENDES, C. U. S. **Mapeamento do Mercado Brasileiro de Antibióticos.** Dissertação (Mestrado em Engenharia Bioquímica). Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, 2004.
- MENDEZ, A.; CHAGASTELLES, P.; PALMA, E.; NARDI, N.; SCHAPOVAL, E. **Thermal and alkaline stability of meropenem: degradation products and cytotoxicity.** *International Journal of Pharmaceutics*, v. 350, p. 95 – 102, 2008.
- MOHAN, M.; RAMACHANDRAN, D.; SANKAR, T. V.; ANANDAN R. **Influence of pH on the solubility and conformational characteristics of muscle proteins from mullet (*Mugil cephalus*).** *Process Biochemistry*, v. 42, p. 1056–1062, 2007.
- MOTA, F. L.; CARNEIRO, A. P.; QUEIMADA, A. J.; PINHO, S. P.; MACEDO, E. A. **Temperature and solvent effects in the solubility of some pharmaceutical compounds: Measurements and modeling.** *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 37, p. 499–507, 2009.
- MOTA, F. L.; QUEIMADA, A. J.; PINHO, S. P.; MACEDO, E. A. **Solubility of drug-like molecules in pure organic solvents with the CPA EoS.** *Fluid Phase Equilibria*, v. 303, p. 62–70, 2011.

- MRESTANI, Y.; NEUBERT, R.; MUNK, A.; WIESE, M. **Determination of dissociation constants of cephalosporins by capillary zone electrophoresis.** Journal of Chromatography A, v. 803, p. 273–278, 1998.
- ORABI, A.S. **Physicochemical properties of ampicillin and amoxicillin as biologically active ligands with some alkali earth, transition metal, and lanthanide ions in aqueous and mixed solvents at 20, 30, and 40 °C.** Journal of Solution Chemistry, v. 34, p. 95–110, 2005.
- ORELLA, C. J.; KIRWAN, D. J. **The solubility of amino acids in mixtures of water and aliphatic alcohols.** Biotechnology Progress, v. 5, p. 89–91, 1989
- ORELLA, C. J.; KIRWAN, D. J. **Correlation of amino acid solubilities in aqueous aliphatic alcohol solutions.** Industrial & Engineering Chemistry Research, v. 30, p. 1040 - , 1991.
- OSPINA, S.; BARZANA, E.; RAMÍREZ, O. T.; LÓPEZ-MUNGUÍA, A. **Effect of pH in the synthesis of ampicillin by penicillin acylase.** Enzyme and Microbial Technology, v. 19, p. 462–469, 1996.
- PÁDUA, T. F. **Monitoramento de reator enzimático para produção de ampicilina.** 184f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Universidade Federal de São Carlos. São Carlos. 2008.
- PAZUKI, G. R.; NIKOOKAR, M. **A new local composition model for predicting of activity coefficient and solubility of amino acids and peptides in water.** Biochemical Engineering Journal, v. 28, p. 44–49, 2006.
- PAZUKI, G.R.; HOSSEINBEIGI, H.R.; EDALAT, M. **Correlation of phase equilibria of amino acids and peptides in aqueous solution based on the perturbation theory of equation of state.** Fluid Phase Equilibria, v. 240, p. 40–45, 2006.
- PAZUKI, G. R.; TAGHIKHANI, V.; VOSSOUGH, M. **Correlation and prediction the activity coefficients and solubility of amino acids and simple peptide in aqueous solution using the modified local composition model.** Fluid Phase Equilibria, v. 255, p. 160–166, 2007.
- PELCZAR, JR. M. J.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R. **Microbiologia: conceitos e aplicações.** v. 2. 2ª Ed. São Paulo, MAKRON Books, 1996.
- PEREGRINE, D. H. G.; GASPARETTO, C. A. **Whey proteins solubility as function of temperature and pH.** Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie, v. 38, p. 77–80, 2005.
- PESSÔA FILHO, P. A.; MAURER, G. **An extension of the Pitzer equation for the excess Gibbs energy of aqueous electrolyte systems to aqueous polyelectrolyte solutions.** Fluid Phase Equilibria, v. 269, p. 25–35, 2008.
- PEREIRA, A. V.; GARABELI A. A.; SCHUNEMANN G. D.; BORCK, P. C. **Determinação da constante de dissociação (ka) do captopril e da nimesulida –**

**Experimentos de química analítica para o curso de farmácia.** Química Nova, v. 34, p. 1656–1660, 2011.

PETSEV, D. N.; THOMAS, B. R.; YAU S. –T.; TSEKOVA, D.; NANEV, C.; WILLIAM WILSON, W.; VEKILOV, P. G. **Temperature-independent solubility and interactions between apoferritin monomers and dimers in solution.** Journal of Crystal Growth, v. 232, p. 21–29, 2001.

PINHO S. P.; SILVA C. M.; MACEDO E. A. **Solubility of amino acids: A group contribution model involving phase and chemical equilibria.** Industrial & Engineering Chemistry Research, v. 33, p. 1341–1 347, 1994.

POBUDKOWSKA, A.; DOMANSKA, U.; JURKOWSKA, B.A.; DYM CZUK, K. **Solubility of pharmaceuticals in water and alcohols.** Fluid Phase Equilibria, v. 392, p. 56–64, 2015.

PRADHAN, A.A.; VERA, J.H., **Effect of Acids and Bases on the Solubility of Amino Acids.** Fluid Phase Equilibria, v. 152, p. 121–132, 1998.

PRAUSNITZ, J. M.; LICHTENTHALER, R. N.; AZEVEDO, E. G. **Molecular Thermodynamics of Fluid-Phase Equilibria.** 3<sup>a</sup> Ed. Nova Jersey, Prentice-Hall, 1999.

QIANG, Z.; ADAMS, C. **Potentiometric determination of acid dissociation constants ( $pK_a$ ) for human and veterinary antibiotics.** Water Research, v. 38, p. 2874–2890, 2004.

RIBEIRO, M. P. A. **Operação ótima de reator para sínteses enzimática de ampicilina com cristalização simultânea dos produtos.** 202 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química). Universidade Federal de São Carlos. São Carlos, 2007.

ROMERO, C.M.; OVIEDO, C.D. **Effect of temperature on the solubility of  $\alpha$ -amino acids and  $\alpha,\omega$ -amino acids in water.** Journal of Solution Chemistry, v. 42, p. 1355 – 1362, 2013.

RUCHENSTEIN, E.; SHULGIN, I. L. **Effect of salts and organic additives on the solubility of proteins in aqueous solutions.** Advances in Colloid and Interface Science, v. 123–126, p. 97 – 103, 2006.

RUDOLPH, E. S. J.; ZOMERDIJK, M.; LUYBEN, K. CH. A. M.; VAN DER WIELEN, L. A. M. **Correlating the phase behaviour of semi-synthetic antibiotics and their precursors in water + 1-butanol mixtures.** Fluid Phase Equilibria, v. 158–160, p. 903–912, 1999.

RUDOLPH, E. S. J.; ZOMERDIJK, M.; OTTENS, M.; VAN DER WIELEN, L. A. M. **Solubilities and partition coefficients of semi-synthetic antibiotics in water + 1-butanol systems.** Industrial and Engineering Chemistry, v. 40, p. 398–406, 2001.

RUETHER, F.; SADOWSKI, G. **Modeling the solubility of pharmaceuticals in pure solvents and solvent mixtures for drug process design.** Journal of Pharmaceutical Sciences, v. 98, p. 4205–4215, 2009

SADEGHI, R. **Thermodynamic representation of phase equilibrium behavior of aqueous solutions of amino acids by the modified Wilson model.** Fluid Phase Equilibria, v. 260, p. 266 – 274, 2007.

- SANDLER, S. I. **Chemical, biochemical, and engineering thermodynamics**. Cap 15, 4ª Ed. NJ. Hoboken : J. Wiley & Sons, 2006.
- SANTANA, M. C. **Estudo experimental da solubilidade dos compostos presentes na síntese enzimática de ampicilina**. 162 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Universidade Federal da Bahia. Salvador, 2007.
- SANTANA, M., RIBEIRO, M. P. A.; LEITE, G. A.; GIORDANO, R. L. C.; GIORDANO, R. C.; MATTEDI, S. **Solid-liquid equilibrium of substrates and products of the enzymatic synthesis of ampicillin**. *Alche Journal*, v. 56, p. 1578–1583, 2010.
- SCHROËN, C. G. P. H.; NIERSTRASZ, V. A.; KROON, P. J.; BOSMA, R.; JANSSEN, A. E. M.; BEEFTING, H. H. E. **Thermodynamically controlled synthesis of  $\beta$ -lactam antibiotics. Equilibrium concentrations and side-chain properties**. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 24, p. 498–506, 1999.
- SEYFI, S.; PAZUKI, G.; AGHAMIRI, S.F.; BEHESHTI M. **On the prediction of equilibrium phase behavior of amino acids in aqueous and aqueous-electrolyte solutions using SAFT equation of state**. *Fluid Phase Equilibria*, v. 287, p. 15–22, 2009.
- SHALAEVA, M.; KENSETH, J.; LOMBARDO, F. **Measurement of dissociation constants ( $pK_a$  Values) of organic compounds by multiplexed capillary electrophoresis using aqueous and cosolvent buffers**. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 97, p. 2581–2606, 2008.
- SIQUEIRA, A. K. B; GONÇALVES, L. R. B.; GIORDANO, R. C.; GIORDANO, R. L. C.; FERREIRA, A. L. O. **Ampicillin synthesis catalyzed by penicillin acylase: effect of pH and type of carriers on selectivity and yield**. In: 2nd Mercosur Congress on Chemical Engineering, 4th Mercosur Congress on Process Systems Engineering. Rio de Janeiro, 2005.
- SU, M.; WANG, J.; HOU, Y. **Solubility of 6-Aminopenicillanic Acid in Aqueous Salt Solutions from 273.15 K to 303.15 K**. *Journal of Chemical & Engineering Data*, v. 52, p. 2266–2268, 2007.
- TAKÁCS-NOVÁK, K.; BOX, K.J.; AVDEEF, A. **Potentiometric  $pK_a$  determination of water-insoluble compounds: validation study in methanol/water mixtures**. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 151, p. 235–248, 1997.
- TOMÉ, L. I. N.; JORGE, M.; GOMES, J. R. B.; COUTINHO, J. A. P. **Toward an understanding of the aqueous solubility of amino acids in the presence of salts: a molecular dynamics simulation study**. *Journal of Physical Chemistry B*, v. 114, p. 16450 – 1645, 2010.
- TSENG, H.; LEE, C.; WENG, W.; SHIAH, I. **Solubilities of amino acids in water at various pH values under 298,15K**. *Fluid Phase Equilibria*, v. 285, p. 90–95, 2009.
- TSUJI, A.; NAKASHIMA, E.; HAMANO, S.; YAMANA, T. **Physicochemical properties of amphoteric  $\beta$ -lactam antibiotics I: stability, solubility and dissociation behavior of**

**amino penicillins as a function of pH.** Journal of Pharmaceutical Sciences, v. 67, p. 1059–1066, 1978.

ULINJ, R. V.; JANSSEN, A. E. M.; MOORE, B. D.; HALLING, P. J. **Predicting when Precipitation-Driven Synthesis Is Feasible: Application to Biocatalysis.** Chemistry – A European Journal, v. 7, p. 2089–2098, 2001.

VAN BERLO, M.; GUDE, M. T.; VAN DER WIELEN, L. A. M.; LUYBEN, K. CH. A. M. **Partition coefficients and solubilities of glycine in the ternary solvent system 1-butanol + ethanol + water.** Industrial & Engineering Chemistry Research, v. 36, p. 2474–2482, 1997.

VIEIRA, M. F. **Separação de ampicilina produzida enzimaticamente por reação entre ester metílico de fenilglicina e ácido 6-aminopenicilânico.** 167f. Tese (Doutorado em Engenharia Química). Universidade Federal de São Carlos. São Carlos. 2003.

WERTHEIM, M. S. **Fluids with highly directional attractive forces. I. Statistical thermodynamics.** Journal of Statistical Physics, v. 35, p. 19–34, 1984a.

WERTHEIM, M. S. **Fluids with highly directional attractive forces. II. Thermodynamic perturbation theory and integral equations.** Journal of Statistical Physics, v. 35, p. 35–47, 1984b

WERTHEIM, M. S. **Fluids with highly directional attractive forces. III. Multiple attraction sites.** Journal of Statistical Physics, v. 42, p. 459–476, 1986a.

WERTHEIM, M. S. **Fluids with highly directional attractive forces. IV. Equilibrium polymerization.** Journal of Statistical Physics, v. 42, p. 477–492, 1986b.

WONG, W. S.; CAMIRON, W. M.; PAVLATH, A. E. **Structures and functionality of milk proteins.** Critical Reviews in Food Science and Nutrition, v. 36, 807–844, 1996.

XU, X.; PINHO, S. P.; MACEDO, E. A. **Activity coefficient and solubility of amino acids in water by the modified wilson model.** Industrial & Engineering Chemistry Research, v. 43, p. 3200–3204, 2004.

YOUSKO, M. I.; VAN LANGEN, L. M.; VROOM, E. DE; MOODY, H. M.; RANTWIJK, F. V.; SHELDON, R. A.; SVEDAS, V. K. **Penicillin acylase-catalyzed synthesis of ampicillin in “aqueous solution – precipitate” systems. High substrate concentration and supersaturation effect.** Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, v. 10, p. 509–515, 2000.

ZHANG, Y.; FURYK, S.; BERGBREITER, D. E.; CREMER, P. S. **Specific Ion Effects on the Water Solubility of Macromolecules: PNIPAM and the Hofmeister Series.** Journal of the American Chemical Society, v. 127, p. 14505 – 14510, 2005.

ZHANG, T.; LI, Z.; WANG, Y.; LI, C.; YU, B.; ZHENG, X.; JIANG, L.; GONG, J. **Determination and correlation of solubility and thermodynamic properties of L-methionine in binary solvents of water + (methanol, ethanol, acetone).** The Journal of Chemical Thermodynamics, v. 96, p. 82 – 92, 2016,

*REFERÊNCIAS*

ZAWOROTKO, M.J.; HAMMUD, H.H.; ABBAS, I.; KRAVTSOV, V.CH.; MASOUD, M.S. **Ampicillin acidity and formation constants with some metals and their thermodynamic parameters in different media. Crystal structures of two polymorphs isolated from the reaction of ampicillin with copper(II).** *Journal of Coordination Chemistry*, v. 59, p. 65–84, 2006.

# APÊNDICE A – ARTIGOS PUBLICADOS

## A.1 Resultados de amoxicilina

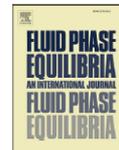
Fluid Phase Equilibria 422 (2016) 78–86



Contents lists available at ScienceDirect

Fluid Phase Equilibria

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/fluid](http://www.elsevier.com/locate/fluid)



### Solubility measurements of amoxicillin in mixtures of water and ethanol from 283.15 to 298.15 K



I.M.B. Felix<sup>a, b, \*</sup>, L.C. Moreira<sup>c</sup>, O. Chiavone-Filho<sup>c</sup>, S. Mattedi<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Chemical Engineering Graduate Program, Polytechnic School, Federal University of Bahia, Rua Aristides Novis, n° 2, 40210-630, Salvador-BA, Brazil

<sup>b</sup> Rural Federal University of Semi-Árido, RN 233, KM 01, Sítio Nova Esperança II, 59700-000, Caraiúbas-RN, Brazil

<sup>c</sup> Chemical Engineering Department, Federal University of Rio Grande do Norte, Av. Senador Salgado Filho, n° 3000, NUPEG-NTI, 59066-800, Natal-RN, Brazil

#### ARTICLE INFO

##### Article history:

Received 30 October 2015

Received in revised form

23 February 2016

Accepted 24 February 2016

Available online 3 March 2016

##### Keywords:

Amoxicillin

Solubility

Enzymatic synthesis

Ethanol

Dissociation constant

#### ABSTRACT

Among the various types of existing antibiotics, amoxicillin stands out as a semi synthetic penicillin widely used on a world scale. The enzymatic synthesis of amoxicillin has arisen as an alternative to the drawbacks of conventional chemical synthesis. Nevertheless, to make it feasible a wide data basis of solubility is required in different conditions of industrial interest, aiming at crystallization and subsequent purification of the antibiotic. In this case, the variables such as temperature, pH and solvent composition are of fundamental importance. This work presents solubility data of amoxicillin in aqueous media using an analytical method. The solubility measurements were carried out at 283.15–298.15 K, varying the pH between 2 and 8, and ethanol composition up to 70 wt%. Dissociation constants have also been measured at the studied values of temperature and ethanol composition, using potentiometric titration. The values of  $pK_a$  demonstrated to be in agreement with the solubility behavior observed experimentally. Thus, the ideal model based on  $pK_a$  values has been applied as reference for the representation of the solubility data. Furthermore, the experimental solubility and  $pK_a$  data sets can be used for correlation and thermodynamic modeling purposes.

© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

#### 1. Introduction

Biomolecules are being increasingly employed in different industries, e.g. food, pharmaceutical, biodiesel and detergents, so on. Furthermore, the use of enzymatic processes combines technological development with renewable raw materials and environmental preservation.

Amoxicillin (AMOX) or (2S,5R,6R)-6-[[[(2R)-2-amino-2-(4-hydroxyphenyl)acetyl]amino]-3,3-dimethyl-7-oxo-4-thia-1-azabicyclo[3.2.0]heptane-2-carboxylic acid according IUPAC is one of the most important semi-synthetic penicillins. Its enzymatic synthesis has been extensively studied as an alternative to conventional rote because it is an environmentally clean process, which occurs in mild operating conditions. However, its yield is limited because of hydrolytic reactions of the substrate and antibiotic competing with the formation of the antibiotic. One way to

reduce the hydrolysis of antibiotic and increase productivity is by decreasing its concentration in the reaction medium, i.e., taking it to the solid phase by crystallization.

By simultaneously having acidic and basic species in its structure, AMOX presents characteristics similar to amino acids and proteins. In solution, this compound exhibits different ionic forms, depending on the condition of the medium, as shown in Fig. 1. These chemical species have very different properties with respect to solubility in water, volatility, and reactivity with chemical oxidants. In some cases, differ also in UV absorption. The dissociation constant ( $pK_a$ ) is an important parameter for predicting the ionization state of the molecule as function of the pH [1,2].

Solubility data of biomolecules in water is essential to the steps of separation and purification. It is affected by various factors such as the structure of the molecule (ionic species) and environmental conditions (pH, temperature, ionic strength, type and concentration of salts and solvents present).

The solubility and chemical equilibrium data involving biomolecules are frequently not available in the literature, and in some cases thermodynamic models can be used to predict these properties. Moreover, the predicted solubility values have often low

\* Corresponding author. Rural Federal University of Semi-Árido, RN 233, Km 01, Sítio Nova Esperança II, 59700-000, Caraiúbas-RN, Brazil.  
E-mail address: [itala@ufersa.edu.br](mailto:itala@ufersa.edu.br) (I.M.B. Felix).

## A.2 Resultados de ampicilina e fenilglicina

## ARTICLE IN PRESS

Fluid Phase Equilibria xxx (2015) 1–9



Contents lists available at ScienceDirect

Fluid Phase Equilibria

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/fluid](http://www.elsevier.com/locate/fluid)

## Effect of ethanol on the solubility of ampicillin and phenylglycine in aqueous media

I.M.B. Felix<sup>a, b, \*</sup>, O. Chivone-Filho<sup>c</sup>, S. Mattedi<sup>a</sup><sup>a</sup> Chemical Engineering Graduate Program, Polytechnic School, Federal University of Bahia, Rua Aristides Novis, n° 2, 40210-630, Salvador, BA, Brazil<sup>b</sup> Rural Federal University of Semi-Árido, RN 233, KM 01, Sítio Nova Esperança II, 59700-000, Caraiúbas, RN, Brazil<sup>c</sup> Chemical Engineering Department, Federal University of Rio Grande do Norte, Av. Senador Salgado Filho, n° 3000, NUPEG-NTI, 59066-800, Natal, RN, Brazil

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 9 August 2015

Received in revised form

2 October 2015

Accepted 6 November 2015

Available online xxx

## Keywords:

Ampicillin

Solubility

Dissociation constant

Enzymatic synthesis

## ABSTRACT

Ampicillin is one of the most consumed antibiotics. Due to environmental issues the production of ampicillin has been forbidden by the conventional chemical route. An alternative is the enzymatic route followed by crystallization of the antibiotic. Therefore, this work aims the determination of a series of ampicillin and phenylglycine solubility data in aqueous media using an analytical method. The measurements were carried out at 283.15 and 298.15 K, varying the pH between 3 and 8, and ethanol composition up to 70 wt%. Dissociation constants (pKa's) have also been measured at the studied temperatures and ethanol compositions. It is demonstrated that ideal thermodynamic model with the predetermined pKa's is able to describe satisfactorily solubility profiles. Solubility measurements of ampicillin and phenylglycine have been determined at different conditions of industrial interest. These data may be applied for the evaluation of the crystallization step of ampicillin in the enzymatic synthesis.

© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Introduction

The discovery of ampicillin represented a landmark in the era of antibiotics, being still the most commonly prescribed class of antibiotics in human and veterinary medicine. Amoxicillin and ampicillin are in the list of the most consumed antibiotics. Both are semi-synthetic penicillin belonging to the class of  $\beta$ -lactams, whose structure presents a  $\beta$  lactam heteroatomic ring responsible for the antibacterial activity. Brazil, for instance, in 2014 closed its trade balance of medicines containing ampicillin (AMP) and its salts in 3.99 million US\$ FOB negative, corresponding to 80.8 tons. This year the importations already reached 2.24 million US\$ FOB [1].

Traditionally these antibiotics are produced on industrial scale by chemical synthesis in a complex process requiring extreme conditions of temperature and the use of toxic solvents, generating non-biodegradable wastes [2,3]. Due to environmental laws increasingly restrict, this route is not allowed in many countries. The enzymatic synthesis appears as an alternative, where the

antibiotic is produced at moderate temperatures and without the use of toxic solvents. However, this process presents a series of side reactions. That is, beyond the antibiotic synthesis, there is hydrolysis of the substrate and antibiotic itself, yielding 6-aminopenicillanic acid (6-APA), phenylglycine (PG) and alcohol, as byproducts. These undesirable reactions promote low yield to the process, when compared to the conventional process.

When the antibiotic is removed from liquid phase, it becomes unavailable for hydrolysis, making the crystallization a promising technique. Several studies have been conducted to determine the most effective method for obtaining these antibiotics in its pure form right after production. Examples of these techniques are extraction involving volatile solvents or ionic liquids [4,5], liquid–liquid extraction [6], and introduction of cosolvents and polymeric resins [7–10]. However, the technique that stands out is the crystallization, as suggested by Youshko et al. [11] for the synthesis of ampicillin. Therefore, the knowledge of the antibiotic solubility is essential for the process.

Reports of ampicillin's solubility are scarce in the literature at different operating conditions. Santana et al. [12] obtained AMP and PG data in pure water varying pH and temperature, i.e., 5.5 to 7.5 and 283.15–298.15 K, respectively. Rudolph et al. [13] presented solubility data in pure water varying pH at 298.15 K. They also

\* Corresponding author. Chemical Engineering Graduate Program, Polytechnic School, Federal University of Bahia, Rua Aristides Novis, n° 2, 40210-630, Salvador, BA, Brazil.

E-mail address: [itala@ufersa.edu.br](mailto:itala@ufersa.edu.br) (I.M.B. Felix).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.fluid.2015.11.008>

0378-3812/© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

Please cite this article in press as: I.M.B. Felix, et al., Effect of ethanol on the solubility of ampicillin and phenylglycine in aqueous media, Fluid Phase Equilibria (2015), <http://dx.doi.org/10.1016/j.fluid.2015.11.008>

## APÊNDICE B – CURVA DE CALIBRAÇÃO DO ELETRODO DE PH

Para a obtenção das medidas de pH confiáveis em diferentes composições da mistura água + etanol, foi realizada a calibração do eletrodo de pH utilizado nos ensaios seguindo as normas estabelecidas pela IUPAC e apresentadas por Sandengen *et al.* (2007). O procedimento partiu do preparo de soluções 0,05 molal de KHPH nas diferentes composições de etanol estudadas (0, 10, 30, 50, 70% m/m). Para isso, o KHPH foi mantido à 120 °C por 1 h na estufa para a remoção de possível umidade. Em seguida estas soluções foram utilizadas para determinar o pH em cada temperatura estudada (10, 15, 20 e 25 °C). Tais medidas correspondem ao  $pH_{med}$ .

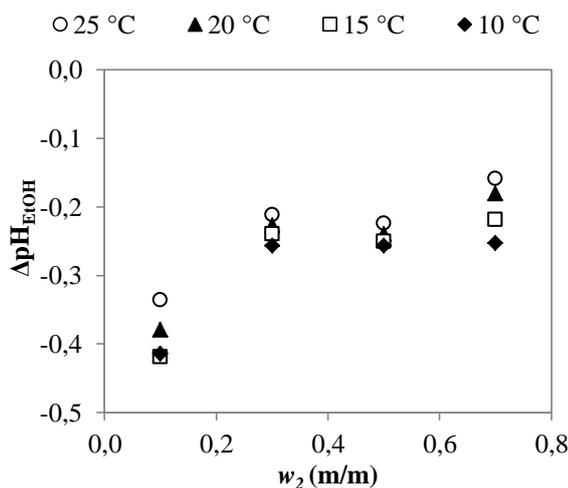
Todos os valores de referência padrão do pH (*Reference Value Standard* –  $pH_{RVS}$ ) nas diferentes temperaturas e composições de etanol foram obtidos a partir da correlação apresentada por Longhi *et al.* (1989), segundo a Equação B.1.

$$pH_{RVS} = 3,9947 - 0,404w_2^{1/2} + 8,33w_2 - 15,18w_2^2 + 11,38w_2^3 + 0,3604u - 32,99u \cdot w_2^2 + 67,8u \cdot w_2^3 + 13,22[\ln(1+z) - u] \quad (B.1)$$

onde  $z = (T - 298,15)/298,15$ ,  $u = z/(1+z)$ , T é a temperatura em Kelvin e  $w_2$  é a fração mássica de etanol na mistura de solventes livre de soluto. Com isso, o efeito do etanol sobre o pH é descrito por  $\Delta pH_{EtOH}$  de acordo com a Equação B.2. A Figura B.1 apresenta os valores de  $\Delta pH_{EtOH}$  obtidos em função da temperatura e composição de etanol.

$$\Delta pH_{EtOH} = pH_{RVS} - pH_{med} \quad (B.2)$$

**Figura B.1 – Calibração do eletrodo de pH em diferentes temperaturas e composições de etanol**



*APÊNDICE B – CURVA DE CALIBRAÇÃO DO ELETRODO DE PH*

Após a calibração realizada no eletrodo de trabalho, o pH atual foi obtido a partir da Equação B.3.

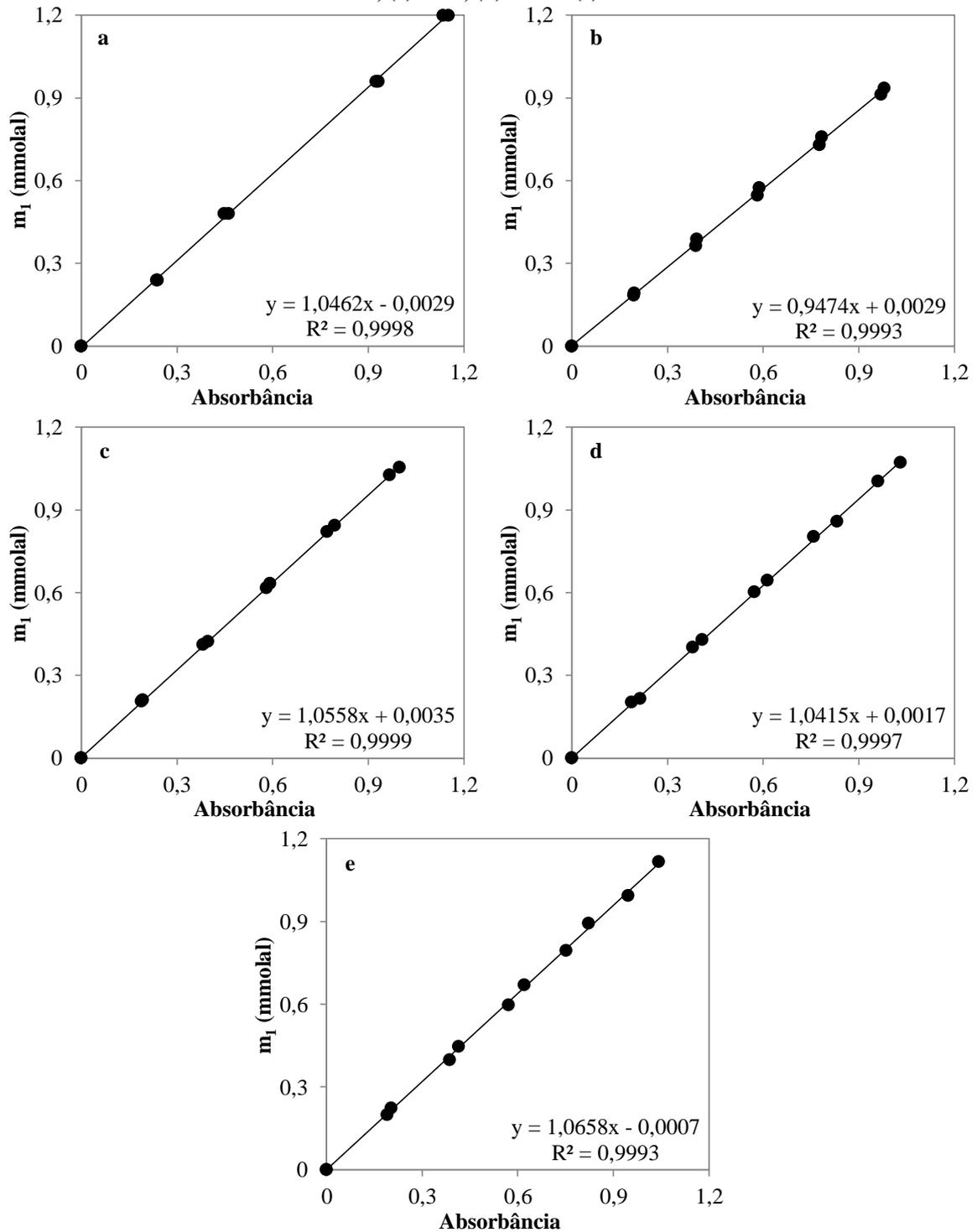
$$\text{pH} = \text{pH}_{\text{med}} - \Delta\text{pH}_{\text{EtOH}} \quad (\text{B.3})$$

## APÊNDICE C – CURVAS DE CALIBRAÇÃO DO ESPECTROFOTÔMETRO

Para quantificar a concentração de soluto das amostras analisadas no espectrofotômetro, foram preparadas curvas de calibração de cada um dos componentes em água pura e em cada composição da mistura água + etanol. Para isso, inicialmente preparou-se soluções estoque gravimétricas de aproximadamente 2 mmolal de AMOX e AMP, e 5 mmolal de HPG e PG. Em seguida, cinco soluções com concentração conhecida foram obtidas por diluição da solução estoque de cada componente, e por fim determinada a absorvância de cada uma. Estes procedimentos foram realizados em triplicata. Logo, considerou-se a curva de calibração como sendo resultado da média entre as duas curvas mais próximas, para cada sistema estudado. Nas Figuras C.1 – C.4 estão apresentadas cada uma com suas respectivas correlações linear.

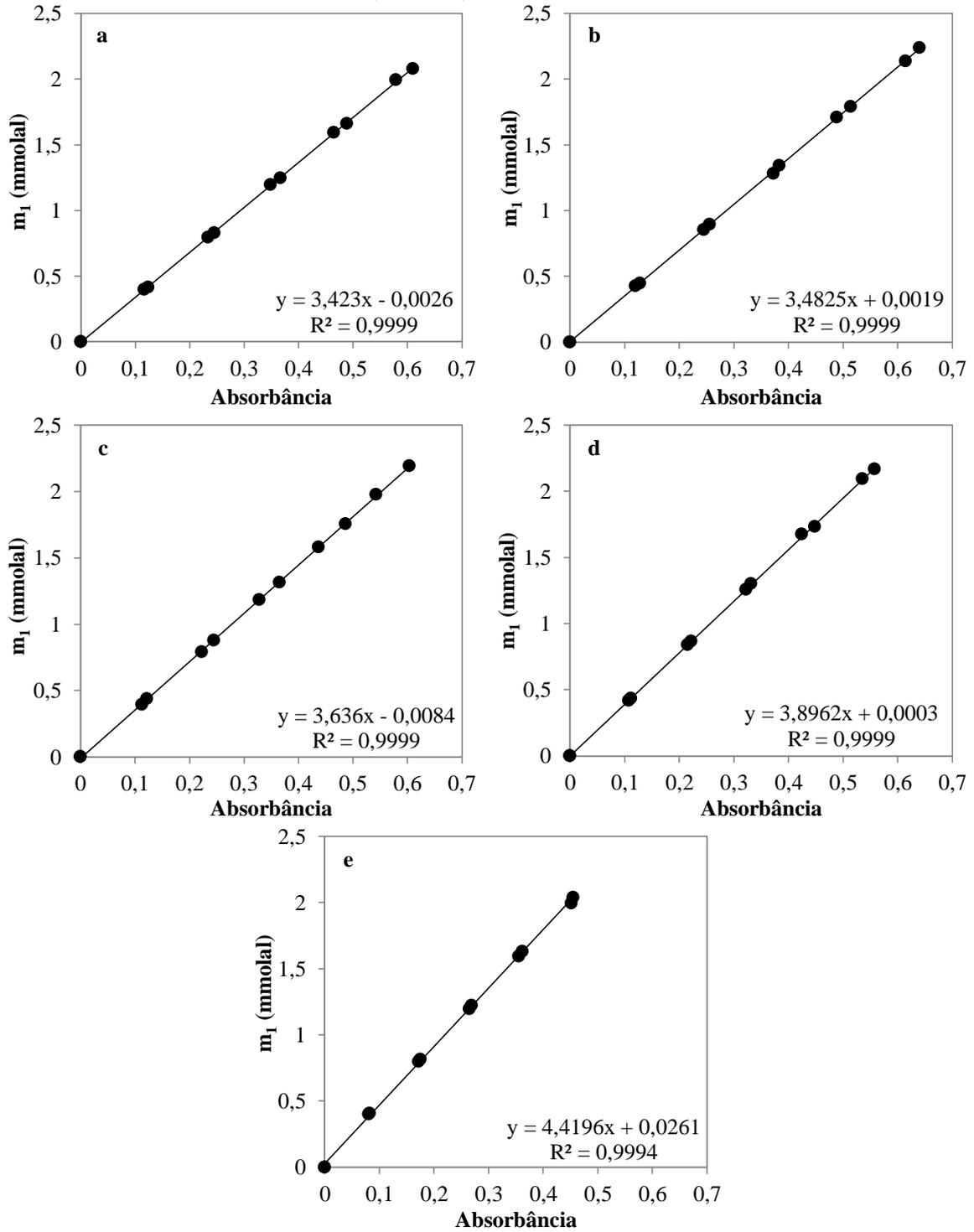
Os componentes estudados apresentaram diferentes perfis de absorção na região do UV-visível. Assim, as leituras foram feitas no comprimento de onda de 273, 262, 273 e 258 nm para as soluções contendo AMOX, AMP, HPG e PG, respectivamente.

**Figura C.1 – Curvas de calibração da amoxicilina (1) em diferentes composições etanol ( $w_2$ ): (a) 0%, (b) 10%, (c) 30%, (d) 50% e (e) 70%**



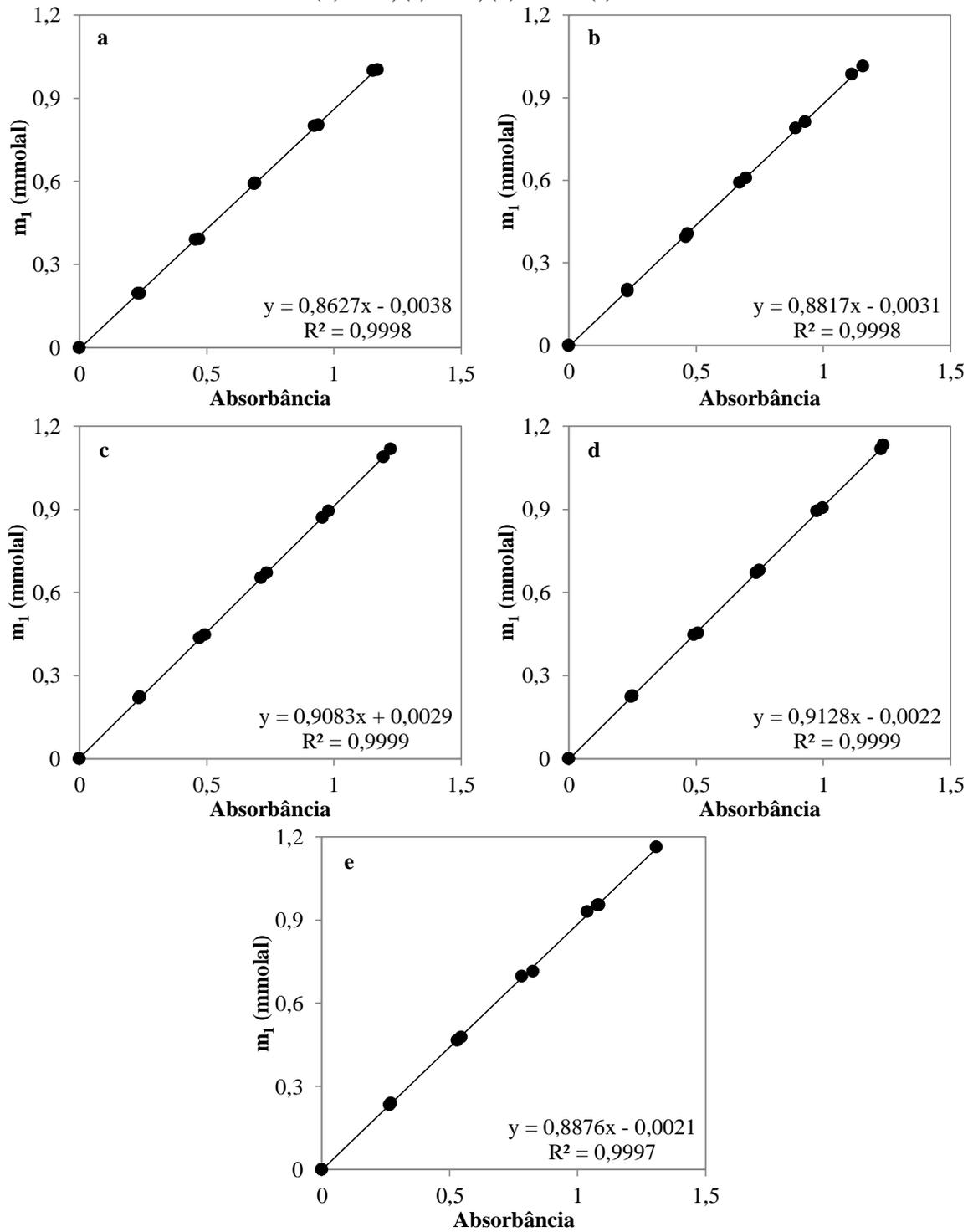
Fonte: Autor

**Figura C.2 – Curva de calibração da ampicilina(1) em diferentes composições de etanol( $w_2$ ): (a) 0%, (b) 10%, (c) 30%, (d) 50% e (e) 70%**



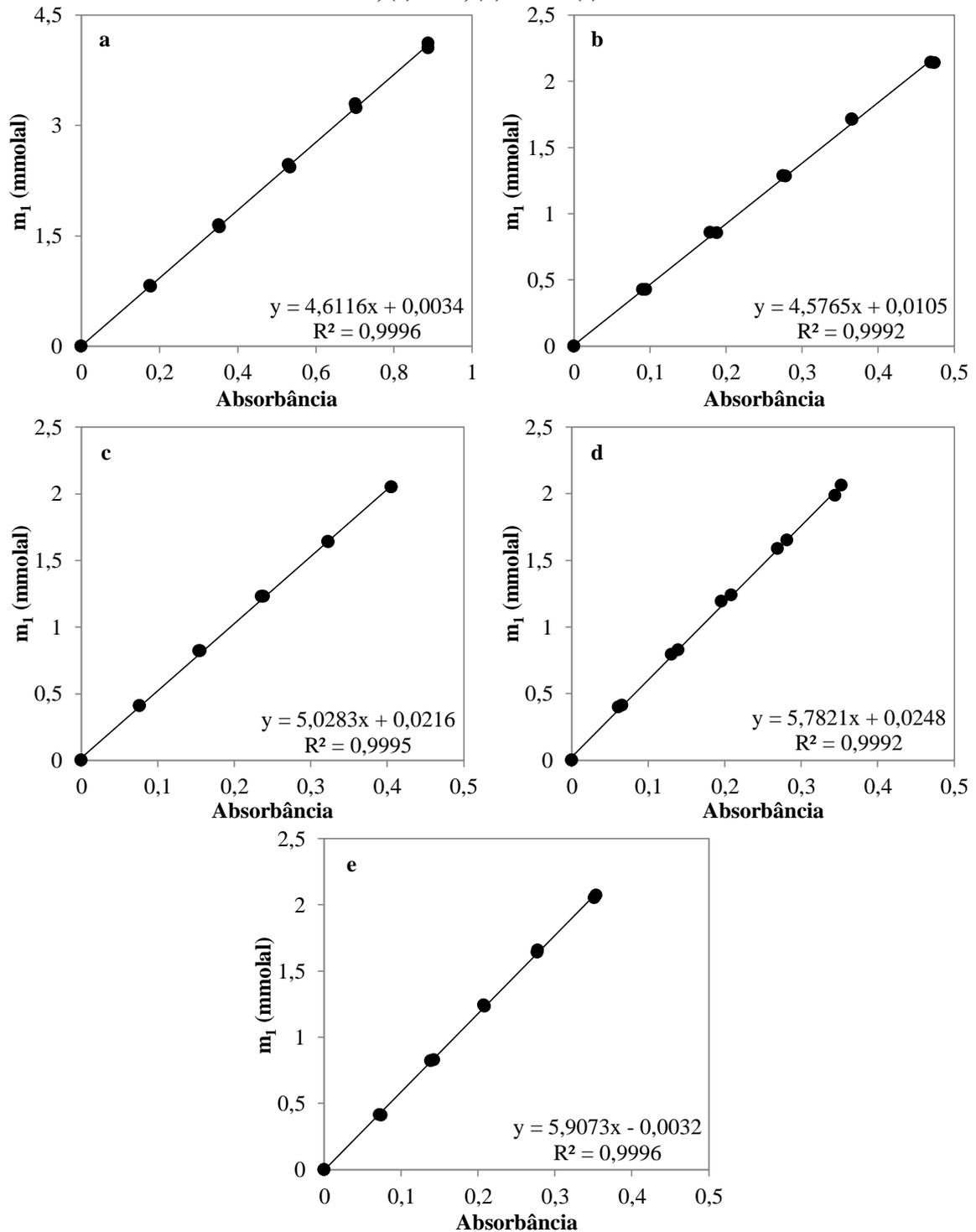
Fonte: Autor

**Figura C.3 – Curva de calibração da hidroxifenilglicina(1) e diferentes composições de etanol( $w_2$ ): (a) 0%, (b) 10%, (c) 30%, (d) 50% e (e) 70%**



Fonte: Autor

**Figura C.4 – Curva de calibração da fenilglicina(1) em diferentes composições de etanol( $w_2$ ): (a) 0%, (b) 10%, (c) 30%, (d) 50% e (e) 70%**



Fonte: Autor

## APÊNDICE D – RESULTADOS EXPERIMENTAIS DE SOLUBILIDADE

**Tabela D.1 – Dados experimentais de solubilidade da amoxicilina (1) em misturas de etanol (2) + água (3) à temperatura  $T = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$  e pressão atmosférica  $p = 0,1013\text{ MPa}$**

$w_2$	pH	$u(\text{pH})$	$m_1$ (mmolal)	$u(m_1)$ (mmolal)	$w_2$	pH	$u(\text{pH})$	$m_1$ (mmolal)	$u(m_1)$ (mmolal)	
0,00	3,49	0,01	7,79	0,15	0,30	5,69	0,01	7,51	0,02	
	4,06	0,03	7,27	0,03		6,26	0,01	9,32	0,09	
	4,61	0,02	6,98	0,12		6,73	0,01	11,23	0,19	
	5,02	0,02	6,67	0,05		7,24	0,01	19,55	0,20	
	0,10	5,49	0,01	7,00	0,06	0,50	3,42	0,06	17,56	0,07
		5,97	0,04	7,31	0,11		3,80	0,01	12,40	0,05
		6,46	0,06	8,18	0,12		4,31	0,05	8,71	0,15
		7,00	0,03	10,58	0,03		4,82	0,03	7,73	0,13
7,47		0,03	18,63	0,20	5,32		0,06	7,64	0,16	
3,15		0,02	7,17	0,07	5,73		0,05	7,51	0,04	
3,83		0,01	6,60	0,19	6,21		0,02	8,69	0,12	
4,27		0,08	6,34	0,18	6,69		0,03	11,49	0,15	
0,30	4,64	0,04	6,44	0,27	0,70	7,18	0,06	21,67	0,04	
	5,12	0,04	6,78	0,21		3,68	0,01	18,25	0,02	
	5,56	0,02	7,03	0,10		4,39	0,06	7,27	0,06	
	6,20	0,04	8,18	0,04		4,83	0,04	5,50	0,06	
	6,79	0,01	12,88	0,03		5,40	0,03	4,40	0,05	
	7,22	0,01	23,02	0,06		5,93	0,01	4,31	0,12	
	3,37	0,01	10,38	0,04		6,38	0,02	5,09	0,11	
	3,84	0,01	8,21	0,01		6,74	0,01	6,07	0,00	
0,30	4,35	0,04	7,42	0,05	7,19	0,01	12,30	0,07		
	4,82	0,01	7,61	0,05	7,27	0,03	14,98	0,03		
	5,19	0,01	7,62	0,04						

$w_2$  = fração mássica de etanol em água livre de soluto;  $u$  = incerteza experimental definida pela Equação 4.6.

Fonte: Autor

**Tabela D.2 – Dados experimentais de solubilidade da amoxicilina (1) em misturas de etanol (2) + água (3) à temperatura  $T = 20\text{ }^{\circ}\text{C}$  e pressão atmosférica  $p = 0,1013\text{ MPa}$**

$w_2$	pH	$u(\text{pH})$	$m_1$ (mmolal)	$u(m_1)$ (mmolal)	$w_2$	pH	$u(\text{pH})$	$m_1$ (mmolal)	$u(m_1)$ (mmolal)
0,00	3,00	0,04	8,26	0,03	0,30	5,61	0,00	6,51	0,11
	3,74	0,05	7,17	0,04		6,44	0,01	7,48	0,26
	4,58	0,08	6,55	0,06		6,64	0,03	8,16	0,17
	5,00	0,01	6,57	0,02		7,13	0,00	11,98	0,16
	5,61	0,01	6,31	0,03		7,70	0,01	29,28	0,03
	6,09	0,01	6,90	0,05	0,50	3,27	0,02	19,55	0,16
	7,09	0,01	8,96	0,07		3,89	0,04	9,37	0,16
	7,52	0,01	11,98	0,12		4,39	0,01	7,36	0,06
	7,71	0,01	16,60	0,15		4,72	0,01	6,90	0,07
0,10	2,29	0,03	15,00	0,04	0,70	5,29	0,01	6,60	0,15
	2,81	0,08	7,03	0,12		5,60	0,01	6,68	0,08
	3,24	0,03	5,84	0,06		6,26	0,00	7,12	0,08
	3,82	0,03	5,55	0,07		6,83	0,04	9,73	0,06
	4,33	0,01	5,44	0,03		7,48	0,01	20,78	0,13
	4,61	0,01	5,39	0,10	3,62	0,01	20,76	0,09	
	5,20	0,06	5,49	0,03	3,72	0,09	14,23	0,20	
	5,46	0,01	5,54	0,05	4,03	0,02	8,56	0,06	
	5,73	0,01	5,65	0,06	4,64	0,01	5,66	0,06	
	6,76	0,00	7,28	0,08	5,18	0,01	4,50	0,07	
7,45	0,02	16,25	0,03	5,63	0,02	3,89	0,02		
0,30	3,24	0,03	9,62	0,12	6,17	0,02	4,20	0,12	
	3,64	0,01	7,37	0,11	6,52	0,01	4,58	0,10	
	4,16	0,01	6,39	0,11	7,18	0,00	7,29	0,01	
	4,63	0,02	6,34	0,18	7,74	0,01	16,58	0,11	
	5,16	0,01	6,36	0,15					

$w_2$  = fração mássica de etanol em água livre de soluto;  $u$  = incerteza experimental definida pela Equação 4.6.

Fonte: Autor

**Tabela D.3 – Dados experimentais de solubilidade da amoxicilina (1) em misturas de etanol (2) + água (3) à temperatura  $T = 15\text{ }^{\circ}\text{C}$  e pressão atmosférica  $p = 0,1013\text{ MPa}$**

$w_2$	pH	$u(\text{pH})$	$m_1$ (mmolal)	$u(m_1)$ (mmolal)	$w_2$	pH	$u(\text{pH})$	$m_1$ (mmolal)	$u(m_1)$ (mmolal)
0,00	2,78	0,01	9,06	0,10	0,30	5,64	0,04	4,69	0,17
	2,86	0,03	7,70	0,15		6,26	0,01	5,07	0,04
	3,58	0,01	5,39	0,08		6,76	0,01	5,34	0,12
	4,06	0,02	5,01	0,09		7,28	0,01	8,58	0,13
	4,57	0,03	5,01	0,11		7,53	0,03	14,50	0,17
	5,82	0,01	5,02	0,04	0,50	3,23	0,01	20,20	0,07
	6,66	0,00	5,19	0,07		3,48	0,02	11,43	0,20
	7,30	0,01	6,65	0,13		3,85	0,08	8,14	0,14
	7,67	0,01	7,65	0,14		4,45	0,03	5,54	0,10
	7,87	0,00	12,68	0,06		4,73	0,09	5,29	0,11
8,03	0,03	17,50	0,23	5,15	0,01	5,14	0,17		
0,10	2,52	0,01	6,85	0,17	0,70	5,85	0,03	4,98	0,06
	2,87	0,03	5,38	0,07		6,27	0,01	5,40	0,15
	3,34	0,01	4,63	0,05		6,57	0,01	5,61	0,06
	4,08	0,01	4,54	0,14		7,06	0,01	7,88	0,08
	4,65	0,02	4,56	0,22		7,47	0,01	13,89	0,10
	5,09	0,01	4,78	0,13	3,44	0,06	26,44	0,15	
	5,97	0,00	4,67	0,09	3,78	0,01	10,32	0,05	
	6,57	0,00	5,47	0,11	4,04	0,08	7,06	0,05	
	7,00	0,04	7,29	0,22	4,15	0,02	5,38	0,05	
	7,50	0,01	13,93	0,19	4,78	0,01	4,00	0,06	
0,30	2,66	0,04	13,98	0,17	5,25	0,02	3,24	0,08	
	3,02	0,04	8,35	0,03	5,80	0,01	3,44	0,14	
	3,30	0,01	5,99	0,14	6,48	0,01	3,48	0,11	
	4,10	0,00	4,98	0,06	6,87	0,01	4,54	0,02	
	4,43	0,01	4,84	0,10	7,44	0,01	8,91	0,13	
	5,03	0,01	4,78	0,04	7,59	0,01	10,42	0,03	

$w_2$  = fração mássica de etanol em água livre de soluto;  $u$  = incerteza experimental definida pela Equação 4.6.

Fonte: Autor

**Tabela D.4 – Dados experimentais de solubilidade da amoxicilina (1) em misturas de etanol (2) + água (3) à temperatura  $T = 10\text{ }^{\circ}\text{C}$  e pressão atmosférica  $p = 0,1013\text{ MPa}$**

$w_2$	pH	$u(\text{pH})$	$m_1$ (mmolal)	$u(m_1)$ (mmolal)	$w_2$	pH	$u(\text{pH})$	$m_1$ (mmolal)	$u(m_1)$ (mmolal)
0,00	3,42	0,01	6,98	0,14	0,30	6,74	0,01	4,49	0,03
	3,81	0,01	5,94	0,05		7,20	0,01	6,08	0,02
	4,59	0,04	5,18	0,12		7,44	0,05	8,58	0,13
	4,96	0,02	4,85	0,17	0,50	7,89	0,01	17,46	0,26
	5,62	0,01	4,74	0,06		3,07	0,04	26,02	0,06
	6,38	0,01	5,28	0,05		3,49	0,01	14,94	0,10
	7,03	0,01	5,81	0,16		4,04	0,03	6,77	0,21
	7,48	0,01	6,48	0,10		4,45	0,09	4,70	0,22
	7,70	0,01	8,27	0,05		5,71	0,07	4,02	0,05
8,07	0,01	12,31	0,04	6,25		0,05	4,19	0,20	
0,10	2,62	0,01	4,31	0,03	0,70	6,59	0,01	4,46	0,10
	3,12	0,05	3,98	0,09		7,26	0,06	6,63	0,05
	3,83	0,01	3,85	0,10		7,48	0,01	7,82	0,06
	4,33	0,01	4,03	0,05		7,61	0,06	8,69	0,04
	4,80	0,08	3,89	0,07		7,87	0,01	15,91	0,06
	5,43	0,01	3,99	0,13		3,28	0,05	26,21	0,06
	6,05	0,02	3,83	0,04		3,80	0,01	11,36	0,07
	6,63	0,01	4,62	0,02		4,31	0,01	5,46	0,19
	7,43	0,01	7,76	0,14		4,56	0,01	4,96	0,18
0,30	7,63	0,01	11,59	0,18	5,54	0,03	2,90	0,14	
	2,53	0,06	26,83	0,05	5,92	0,01	2,67	0,06	
	3,21	0,05	7,72	0,20	6,25	0,01	2,60	0,13	
	3,79	0,01	4,99	0,17	6,96	0,01	3,17	0,14	
	4,90	0,01	4,25	0,17	7,41	0,07	4,82	0,06	
	5,24	0,01	4,46	0,01	7,75	0,01	14,75	0,10	
5,61	0,08	4,45	0,14						

$w_2$  = fração mássica de etanol em água livre de soluto;  $u$  = incerteza experimental definida pela Equação 4.6.

Fonte: Autor

**Tabela D.5 – Dados experimentais de solubilidade da ampicilina (1) em misturas de etanol (2) + água (3) à temperatura  $T = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$  e pressão atmosférica  $p = 0,1013\text{ MPa}$** 

$w_2$	pH	$u(\text{pH})$	$m_1$ (mmolal)	$u(m_1)$ (mmolal)	$w_2$	pH	$u(\text{pH})$	$m_1$ (mmolal)	$u(m_1)$ (mmolal)
0,00	3,06	0,01	34,16	0,59	0,30	3,26	0,01	29,78	0,15
	3,62	0,03	24,34	0,16		3,39	0,01	25,45	0,15
	4,00	0,01	21,65	0,04		3,76	0,01	20,73	0,23
	4,27	0,04	19,27	0,02		4,36	0,05	17,67	0,15
	4,69	0,06	17,36	0,08		4,83	0,01	17,04	0,15
	5,58	0,02	16,19	0,08		5,32	0,06	17,81	0,09
	6,06	0,02	16,75	0,14		5,71	0,01	18,48	0,13
	6,84	0,01	19,06	0,05		6,23	0,01	20,87	0,13
	7,27	0,01	26,42	0,06		6,79	0,02	29,68	0,06
	7,44	0,02	39,47	0,15		7,17	0,01	47,60	0,18
0,10	3,11	0,04	28,32	0,08	0,50	3,40	0,04	49,68	0,34
	3,31	0,01	26,54	0,05		3,93	0,01	26,48	0,14
	3,41	0,01	25,26	0,22		4,35	0,01	20,71	0,08
	3,63	0,04	24,52	0,07		4,35	0,01	20,39	0,10
	3,70	0,01	24,24	0,04		4,81	0,01	17,79	0,13
	3,90	0,01	23,87	0,05		5,17	0,08	17,69	0,16
	4,11	0,04	23,02	0,06		5,74	0,01	17,98	0,13
	4,23	0,01	23,06	0,05		6,45	0,01	23,75	0,17
	4,44	0,01	22,80	0,05		6,79	0,02	31,17	0,12
	4,67	0,02	19,01	0,16		7,24	0,01	76,39	0,15
	5,02	0,06	16,59	0,08	0,70	3,29	0,02	108,33	0,19
	5,32	0,01	15,12	0,07		3,66	0,05	55,26	0,12
	5,53	0,01	14,81	0,15		4,15	0,01	23,41	0,11
	5,56	0,01	14,43	0,10		4,82	0,01	13,78	0,14
	6,12	0,01	14,75	0,06		5,55	0,02	10,90	0,11
	6,44	0,01	17,52	0,16		6,11	0,01	11,35	0,04
	6,79	0,01	20,59	0,07		6,65	0,01	14,57	0,20
	7,03	0,01	25,85	0,12		6,86	0,02	17,27	0,05
	7,08	0,01	29,72	0,07		7,05	0,01	20,46	0,08
						7,45	0,01	75,04	0,28

$w_2$  = fração mássica de etanol em água livre de soluto;  $u$  = incerteza experimental definida pela Equação 4.6.

Fonte: Autor

**Tabela D.6 – Dados experimentais de solubilidade da ampicilina (1) em misturas de etanol (2) + água (3) à temperatura T = 20 °C e pressão atmosférica p = 0,1013 MPa**

$w_2$	pH	$u(\text{pH})$	$m_1$ (mmolal)	$u(m_1)$ (mmolal)	$w_2$	pH	$u(\text{pH})$	$m_1$ (mmolal)	$u(m_1)$ (mmolal)
0,00	3,15	0,01	27,17	0,01	0,10	6,75	0,01	15,64	0,12
	3,27	0,01	22,64	0,11		6,83	0,01	15,72	0,20
	3,85	0,01	16,09	0,13		7,21	0,01	22,64	0,20
	4,20	0,02	15,96	0,11	0,30	3,30	0,01	24,42	0,23
	4,76	0,10	16,67	0,07		3,61	0,02	19,66	0,03
	4,79	0,04	15,81	0,22		4,23	0,05	16,35	0,18
	4,81	0,04	16,15	0,07	0,5	4,91	0,02	15,77	0,05
	5,44	0,01	14,38	0,15		5,85	0,02	16,30	0,19
	5,53	0,01	14,32	0,18		6,45	0,01	17,24	0,14
	5,96	0,04	14,27	0,09		7,00	0,04	21,49	0,26
	6,14	0,01	14,12	0,13		7,14	0,02	23,59	0,06
	6,56	0,01	15,14	0,12		7,22	0,03	26,14	0,13
	6,95	0,04	16,92	0,14		3,48	0,03	36,93	0,17
	7,16	0,01	19,32	0,20		3,96	0,01	22,75	0,12
	7,19	0,01	20,07	0,10		4,54	0,01	17,03	0,09
7,40	0,02	23,58	0,11	5,05		0,02	15,73	0,03	
7,53	0,01	26,00	0,26	5,19	0,08	15,75	0,09		
0,1	2,95	0,01	27,90	0,26	0,70	5,71	0,02	15,98	0,15
	2,97	0,01	25,19	0,22		6,17	0,01	17,60	0,17
	3,50	0,02	18,10	0,11		6,70	0,01	22,42	0,17
	4,06	0,01	14,95	0,05		7,13	0,01	34,92	0,14
	4,51	0,04	13,97	0,15		3,57	0,01	58,41	0,13
	4,54	0,01	13,89	0,10		3,90	0,01	28,47	0,18
	4,55	0,03	13,76	0,20		4,31	0,01	16,22	0,02
	5,24	0,04	11,83	0,06		4,65	0,01	13,22	0,07
	5,41	0,01	11,45	0,12		5,24	0,01	9,99	0,12
	5,74	0,01	11,99	0,17		5,53	0,06	9,90	0,08
	5,97	0,04	12,29	0,09	6,12	0,02	10,40	0,09	
	5,98	0,03	12,29	0,09	6,75	0,01	13,39	0,07	
	6,35	0,01	13,09	0,09	7,15	0,01	18,66	0,15	
6,53	0,01	13,97	0,15						

$w_2$  = fração mássica de etanol em água livre de soluto;  $u$  = incerteza experimental definida pela Equação 4.6.

Fonte: Autor

**Tabela D.7– Dados experimentais de solubilidade da ampicilina (1) em misturas de etanol (2) + água (3) à temperatura T = 15 °C e pressão atmosférica p = 0,1013 MPa**

$w_2$	pH	$u(\text{pH})$	$m_1$ (mmolal)	$u(m_1)$ (mmolal)	$w_2$	pH	$u(\text{pH})$	$m_1$ (mmolal)	$u(m_1)$ (mmolal)
0,00	3,11	0,01	15,25	0,19	0,30	4,39	0,04	13,59	0,04
	3,80	0,02	12,45	0,11		4,63	0,02	13,73	0,17
	4,12	0,06	12,51	0,04		4,90	0,02	13,53	0,24
	4,71	0,01	12,08	0,13		5,01	0,06	13,73	0,07
	4,76	0,01	11,88	0,18		5,23	0,02	13,46	0,13
	5,44	0,01	12,20	0,10		5,36	0,01	11,23	0,15
	6,11	0,04	12,41	0,17		5,62	0,01	13,64	0,22
	6,25	0,01	12,65	0,25		5,89	0,03	9,84	0,06
	6,92	0,01	14,73	0,08		6,26	0,01	9,62	0,21
	7,51	0,02	28,66	0,39		6,55	0,01	10,88	0,17
0,10	2,76	0,01	14,18	0,18	0,50	6,55	0,03	10,91	0,22
	3,18	0,04	11,69	0,20		6,82	0,01	12,06	0,05
	3,76	0,06	11,06	0,12		6,88	0,01	12,10	0,15
	4,04	0,01	10,83	0,16		7,09	0,04	13,44	0,34
	4,44	0,03	10,63	0,06		7,24	0,01	17,70	0,07
	4,78	0,08	9,97	0,27		3,62	0,01	30,28	0,06
	4,95	0,15	9,68	0,11		3,80	0,02	25,07	0,06
	5,15	0,08	9,49	0,31		4,15	0,01	17,40	0,15
	5,55	0,08	9,65	0,24		4,55	0,01	15,33	0,14
	5,56	0,03	9,67	0,14		4,99	0,01	14,62	0,16
0,30	5,87	0,04	9,78	0,15	0,70	5,34	0,04	14,42	0,07
	5,87	0,02	9,99	0,11		5,52	0,01	14,50	0,06
	5,89	0,04	9,94	0,08		5,91	0,01	14,81	0,16
	6,52	0,02	10,99	0,06		6,54	0,01	17,06	0,11
	6,59	0,01	11,24	0,04		7,02	0,01	24,80	0,05
	6,68	0,01	11,69	0,13		3,70	0,01	42,39	0,19
	6,85	0,01	12,83	0,07		3,93	0,03	26,30	0,18
	6,92	0,01	14,14	0,12		4,29	0,01	15,60	0,18
	6,99	0,01	14,12	0,07		5,03	0,01	10,48	0,19
	3,08	0,01	25,70	0,36		5,69	0,06	9,95	0,07
0,30	3,41	0,01	18,27	0,09	6,07	0,01	10,53	0,20	
	3,65	0,01	17,19	0,11	6,67	0,01	12,28	0,06	
	4,05	0,03	14,81	0,17	7,25	0,02	16,24	0,09	
	4,31	0,02	13,98	0,17					

$w_2$  = fração mássica de etanol em água livre de soluto;  $u$  = incerteza experimental definida pela Equação 4.6.

Fonte: Autor

**Tabela D.8 – Dados experimentais de solubilidade da ampicilina (1) em misturas de etanol (2) + água (3) à temperatura  $T = 10\text{ }^{\circ}\text{C}$  e pressão atmosférica  $p = 0,1013\text{ MPa}$** 

$w_2$	pH	$u(\text{pH})$	$m_1$ (mmolal)	$u(m_1)$ (mmolal)	$w_2$	pH	$u(\text{pH})$	$m_1$ (mmolal)	$u(m_1)$ (mmolal)	
0,00	3,14	0,03	16,94	0,12	0,30	4,26	0,01	12,56	0,16	
	3,32	0,02	14,26	0,15		4,37	0,04	11,78	0,14	
	3,86	0,01	12,14	0,11		4,70	0,01	11,72	0,09	
	4,47	0,01	11,92	0,27		4,75	0,05	11,38	0,02	
	4,87	0,01	11,42	0,19		5,17	0,11	11,23	0,18	
	5,17	0,04	11,65	0,14		5,48	0,08	10,85	0,19	
	6,03	0,02	11,69	0,16		5,96	0,01	7,60	0,10	
	6,26	0,13	11,47	0,16		6,01	0,04	7,52	0,12	
	6,48	0,01	11,97	0,07		6,11	0,07	7,59	0,07	
	6,78	0,05	12,12	0,12		6,43	0,01	7,07	0,08	
	7,08	0,01	12,98	0,12		6,60	0,01	6,96	0,15	
	7,40	0,01	14,91	0,05		7,04	0,01	8,60	0,11	
	7,56	0,03	17,09	0,19		7,27	0,04	10,06	0,01	
	0,10	2,47	0,04	14,31		0,11	0,50	3,50	0,01	32,70
2,70		0,01	11,97	0,18	3,99	0,05		20,28	0,06	
2,73		0,06	11,79	0,17	4,34	0,01		16,09	0,04	
3,25		0,01	9,90	0,17	4,73	0,04		13,65	0,16	
3,35		0,02	9,56	0,00	5,35	0,06		13,46	0,07	
3,46		0,03	9,40	0,21	5,72	0,03		13,37	0,10	
3,96		0,06	8,86	0,20	6,07	0,02		13,83	0,11	
4,60		0,01	8,69	0,08	6,69	0,01		16,40	0,15	
4,88		0,04	8,69	0,20	7,14	0,02		22,92	0,09	
5,49		0,13	8,63	0,27	0,70	3,43		0,01	54,39	0,22
6,14		0,07	8,69	0,19		3,96		0,01	25,68	0,16
6,64		0,01	9,41	0,11		4,30		0,01	16,43	0,07
7,07		0,01	11,70	0,10		4,64		0,01	12,40	0,03
7,28		0,01	14,49	0,19		5,02		0,01	10,69	0,12
0,30	3,39	0,01	16,30	0,15		5,64	0,04	9,74	0,06	
	3,55	0,01	15,24	0,05	6,06	0,06	9,70	0,20		
	3,87	0,01	12,92	0,11	6,55	0,02	11,05	0,09		
	3,89	0,01	12,84	0,29	7,12	0,04	14,01	0,13		

$w_2$  = fração mássica de etanol em água livre de soluto;  $u$  = incerteza experimental definida pela Equação 4.6.

Fonte: Autor

**Tabela D.9 – Dados experimentais de solubilidade da hidroxifenilglicina (1) em misturas de etanol (2) + água (3) à temperatura  $T = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$  e pressão atmosférica  $p = 0,1013\text{ MPa}$** 

$w_2$	pH	$u(\text{pH})$	$m_1$ (mmolal)	$u(m_1)$ (mmolal)	$w_2$	pH	$u(\text{pH})$	$m_1$ (mmolal)	$u(m_1)$ (mmolal)
0,00	3,14	0,02	122,27	0,18	0,50	2,97	0,01	58,36	0,18
	3,47	0,02	117,33	0,12		3,25	0,01	47,12	0,13
	4,44	0,01	113,85	0,13		3,78	0,01	36,95	0,19
	5,06	0,03	113,56	0,65		4,74	0,02	34,69	0,23
	6,14	0,03	114,28	0,23		5,61	0,09	34,56	0,22
	6,78	0,04	116,11	0,78		5,97	0,02	34,84	0,24
	7,76	0,01	127,34	0,35		6,35	0,07	35,25	0,25
0,10	3,05	0,01	88,48	0,50	0,70	6,73	0,02	35,29	0,13
	3,86	0,01	86,68	0,36		6,99	0,01	35,55	0,20
	4,72	0,03	85,62	0,67		7,39	0,07	36,20	0,14
	5,77	0,03	87,92	0,25		8,12	0,01	39,04	0,01
	6,71	0,03	89,35	0,24		3,42	0,01	25,33	0,22
	7,62	0,02	97,47	0,07		3,96	0,01	16,89	0,06
0,30	2,92	0,01	70,23	0,41		4,26	0,01	15,46	0,07
	3,99	0,03	58,84	0,25		4,72	0,01	15,07	0,12
	5,02	0,08	57,23	0,05		5,15	0,02	14,91	0,19
	5,80	0,06	56,96	0,75		5,80	0,01	14,69	0,10
	6,36	0,04	58,52	0,31		6,32	0,08	14,59	0,24
	6,77	0,01	59,35	0,01		6,86	0,01	14,82	0,11
	7,25	0,01	62,37	0,11		7,31	0,01	14,83	0,27
	7,81	0,02	66,62	0,34		7,85	0,13	15,53	0,22
						8,23	0,01	17,56	0,24

$w_2$  = fração mássica de etanol em água livre de soluto;  $u$  = incerteza experimental definida pela Equação 4.6.

Fonte: Autor

**Tabela D.10 – Dados experimentais de solubilidade da hidroxifenilglicina (1) em misturas de etanol (2) + água (3) à temperatura  $T = 20\text{ }^{\circ}\text{C}$  e pressão atmosférica  $p = 0,1013\text{ MPa}$** 

$w_2$	pH	$u(\text{pH})$	$m_1$ (mmolal)	$u(m_1)$ (mmolal)	$w_2$	pH	$u(\text{pH})$	$m_1$ (mmolal)	$u(m_1)$ (mmolal)
0,00	2,98	0,01	120,75	0,10	0,30	5,92	0,14	51,21	0,42
	3,65	0,01	111,07	0,26		6,60	0,04	51,33	0,10
	4,13	0,03	109,00	0,43		6,99	0,04	51,69	0,18
	4,93	0,03	108,34	0,08		7,99	0,01	53,50	0,26
	5,62	0,04	108,20	0,39	0,50	3,21	0,05	40,14	0,29
	6,52	0,03	108,21	0,09		3,81	0,06	33,44	0,21
	7,14	0,01	108,75	0,76		4,76	0,01	30,67	0,40
	7,89	0,01	119,34	0,29		5,96	0,02	29,51	0,42
0,10	2,88	0,01	85,66	0,10	0,70	6,80	0,01	29,55	0,17
	4,13	0,04	79,51	0,07		7,15	0,02	29,84	0,61
	4,76	0,04	79,62	0,22		7,83	0,01	31,43	0,08
	5,36	0,03	79,40	0,45		3,26	0,01	36,20	0,13
	6,59	0,04	79,94	0,56	4,06	0,03	15,90	0,26	
	6,99	0,05	81,04	0,53	4,88	0,01	13,47	0,28	
	7,37	0,04	84,36	0,18	5,79	0,04	13,36	0,27	
	7,50	0,01	86,31	0,71	6,12	0,16	13,45	0,01	
0,30	3,30	0,04	59,31	0,45	6,98	0,06	13,73	0,22	
	4,31	0,10	52,34	0,47	7,39	0,01	13,90	0,08	
	5,16	0,08	51,38	0,13	7,76	0,01	13,38	0,15	

$w_2$  = fração mássica de etanol em água livre de soluto;  $u$  = incerteza experimental definida pela Equação 4.6.

Fonte: Autor

**Tabela D.11 – Dados experimentais de solubilidade da hidroxifenilglicina (1) em misturas de etanol (2) + água (3) à temperatura  $T = 15\text{ }^{\circ}\text{C}$  e pressão atmosférica  $p = 0,1013\text{ MPa}$** 

$w_2$	pH	$u(\text{pH})$	$m_1$ (mmolal)	$u(m_1)$ (mmolal)	$w_2$	pH	$u(\text{pH})$	$m_1$ (mmolal)	$u(m_1)$ (mmolal)
0,00	2,92	0,03	119,17	0,35	0,50	2,55	0,01	93,19	0,14
	3,61	0,06	108,61	0,64		2,84	0,07	58,37	0,37
	4,70	0,04	102,37	0,59		2,95	0,11	49,60	0,32
	5,91	0,08	101,47	0,78		3,70	0,03	33,43	0,03
	6,87	0,02	102,57	0,33		4,94	0,01	27,84	0,08
	7,76	0,02	107,13	0,76		5,48	0,01	27,23	0,42
0,10	2,69	0,04	83,67	0,19	0,70	6,16	0,10	28,26	0,33
	3,64	0,06	74,04	0,49		6,84	0,01	28,62	0,3
	4,65	0,10	73,15	0,54		7,56	0,01	30,85	0,33
	5,57	0,10	72,90	0,70		2,85	0,04	33,61	0,19
	6,33	0,04	73,32	0,65		3,83	0,01	15,86	0,15
	7,43	0,01	74,40	0,68		4,86	0,01	12,19	0,11
0,30	2,72	0,11	62,52	0,49		5,77	0,01	12,25	0,04
	3,66	0,11	44,47	0,06		6,54	0,03	11,51	0,22
	5,01	0,11	42,96	0,26		7,63	0,04	12,11	0,09
	5,75	0,01	42,54	0,46					
	6,54	0,03	42,37	0,33					
	7,53	0,01	43,98	0,28					

$w_2$  = fração mássica de etanol em água livre de soluto;  $u$  = incerteza experimental definida pela Equação 4.6.

Fonte: Autor

**Tabela D.12 – Dados experimentais de solubilidade da hidroxifenilglicina (1) em misturas de etanol (2) + água (3) à temperatura  $T = 10\text{ }^{\circ}\text{C}$  e pressão atmosférica  $p = 0,1013\text{ MPa}$** 

$w_2$	pH	$u(\text{pH})$	$m_1$ (mmolal)	$u(m_1)$ (mmolal)	$w_2$	pH	$u(\text{pH})$	$m_1$ (mmolal)	$u(m_1)$ (mmolal)
0,00	3,10	0,01	109,69	0,50	0,30	7,07	0,06	41,75	0,42
	3,97	0,02	99,51	0,59		7,74	0,07	43,19	0,19
	5,01	0,03	97,93	0,07		8,15	0,07	45,42	0,44
	5,70	0,06	98,14	0,51	0,50	2,92	0,01	48,66	0,79
	6,62	0,05	98,16	0,75		3,22	0,01	37,36	0,13
	7,73	0,11	103,54	0,29		3,56	0,11	30,70	0,06
0,10	2,72	0,06	78,90	0,26	0,70	4,41	0,01	24,93	0,34
	3,42	0,06	68,58	0,14		5,41	0,01	24,41	0,60
	4,67	0,01	65,48	0,14		6,34	0,08	24,38	0,39
	5,53	0,01	65,18	0,01		7,04	0,08	25,07	0,08
	6,57	0,01	65,99	0,47		7,79	0,01	25,82	0,28
	7,42	0,03	68,33	0,46		3,40	0,01	22,20	0,17
0,30	3,38	0,01	48,56	0,08	0,70	3,85	0,01	17,03	0,13
	3,76	0,00	44,35	0,18		4,74	0,02	12,76	0,03
	4,81	0,01	41,53	0,47		5,67	0,07	12,30	0,13
	6,06	0,20	41,47	0,58		6,56	0,06	11,83	0,07
	6,74	0,08	41,01	0,31		7,79	0,11	11,94	0,28

$w_2$  = fração mássica de etanol em água livre de soluto;  $u$  = incerteza experimental definida pela Equação 4.6.

Fonte: Autor

**Tabela D.13 – Dados experimentais de solubilidade da fenilglicina (1) em misturas de etanol (2) + água (3) à temperatura  $T = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$  e pressão atmosférica  $p = 0,1013\text{ MPa}$**

$w_2$	pH	$u(\text{pH})$	$m_1$ (mmolal)	$u(m_1)$ (mmolal)	$w_2$	pH	$u(\text{pH})$	$m_1$ (mmolal)	$u(m_1)$ (mmolal)	
0,00	3,07	0,02	33,72	0,08	0,30	5,95	0,04	13,67	0,16	
	3,52	0,01	32,59	0,08		6,46	0,01	13,68	0,04	
	4,22	0,01	32,14	0,04		6,80	0,04	13,70	0,09	
	4,52	0,01	31,95	0,12		7,11	0,01	13,87	0,07	
	5,04	0,04	31,82	0,08		7,64	0,08	14,62	0,16	
	5,61	0,01	31,80	0,08		0,50	2,90	0,01	16,25	0,13
	6,05	0,01	31,79	0,14			3,32	0,01	12,35	0,10
	6,49	0,01	32,02	0,02			3,86	0,01	11,05	0,09
	7,00	0,02	32,27	0,05			4,27	0,01	10,88	0,04
	7,39	0,01	32,88	0,12			4,71	0,01	10,57	0,04
7,94	0,01	34,05	0,06	5,13	0,04		10,48	0,08		
0,10	2,78	0,01	23,57	0,08	0,70		5,69	0,06	10,28	0,08
	3,35	0,01	22,96	0,20			6,32	0,08	10,41	0,05
	3,78	0,01	22,84	0,10			6,85	0,01	10,49	0,14
	4,22	0,01	22,79	0,04			7,24	0,01	10,72	0,09
	4,66	0,01	22,83	0,08		7,68	0,01	11,07	0,11	
	5,25	0,01	22,86	0,02		3,05	0,01	12,31	0,09	
	5,54	0,03	22,86	0,13		3,45	0,01	7,62	0,06	
	6,18	0,02	22,87	0,04		3,93	0,01	6,11	0,04	
	6,59	0,02	23,00	0,08		4,47	0,02	5,56	0,04	
	7,00	0,01	23,31	0,10		4,77	0,02	5,27	0,01	
0,30	7,57	0,01	24,69	0,03	5,41	0,01	5,20	0,06		
	2,91	0,01	15,97	0,12	6,04	0,08	5,23	0,01		
	3,32	0,01	14,51	0,16	6,89	0,03	5,24	0,07		
	3,85	0,01	13,87	0,11	7,09	0,02	5,27	0,05		
	4,38	0,01	13,76	0,10	7,40	0,01	5,26	0,03		
	4,65	0,13	13,70	0,07	7,92	0,04	5,20	0,02		
	5,32	0,05	13,68	0,07						

$w_2$  = fração mássica de etanol em água livre de soluto;  $u$  = incerteza experimental definida pela Equação 4.6.

Fonte: Autor

**Tabela D.14 – Dados experimentais de solubilidade da fenilglicina (1) em misturas de etanol (2) + água (3) à temperatura  $T = 20\text{ }^{\circ}\text{C}$  e pressão atmosférica  $p = 0,1013\text{ MPa}$** 

$w_2$	pH	$u(\text{pH})$	$m_1$ (mmolal)	$u(m_1)$ (mmolal)	$w_2$	pH	$u(\text{pH})$	$m_1$ (mmolal)	$u(m_1)$ (mmolal)
0,00	3,20	0,01	31,08	0,09	0,30	5,91	0,08	12,08	0,09
	3,66	0,01	30,31	0,04		6,56	0,02	12,11	0,13
	4,06	0,01	30,08	0,18		6,80	0,01	12,15	0,13
	4,48	0,01	29,94	0,02		7,21	0,01	12,19	0,08
	5,04	0,04	29,87	0,06		7,73	0,01	12,43	0,06
	5,61	0,01	29,82	0,13	0,50	3,10	0,01	12,45	0,05
	6,28	0,03	29,84	0,17		3,51	0,01	10,41	0,07
	6,71	0,09	29,85	0,04		4,02	0,01	9,64	0,04
	7,09	0,04	29,92	0,01		4,39	0,01	9,37	0,05
	7,61	0,01	30,50	0,18		4,76	0,06	9,21	0,16
0,10	8,18	0,01	32,25	0,20	0,70	5,01	0,09	9,17	0,23
	2,70	0,01	22,76	0,12		5,25	0,01	9,15	0,02
	3,21	0,01	21,65	0,05		5,88	0,11	9,19	0,08
	3,67	0,01	21,06	0,21		6,25	0,08	9,16	0,08
	4,22	0,01	20,99	0,07		6,79	0,05	9,15	0,12
	4,73	0,01	20,86	0,19		7,35	0,02	9,31	0,05
	5,48	0,03	20,86	0,10		7,75	0,04	9,68	0,11
	5,90	0,01	20,79	0,07		3,09	0,01	10,46	0,08
	6,54	0,03	20,96	0,15		3,50	0,02	7,13	0,07
	7,16	0,01	21,18	0,08		3,78	0,02	5,70	0,05
0,30	7,68	0,01	22,49	0,16	4,42	0,01	4,66	0,08	
	2,94	0,01	14,44	0,19	4,91	0,01	4,48	0,04	
	3,35	0,01	13,13	0,27	5,37	0,15	4,35	0,03	
	3,38	0,01	12,86	0,18	5,98	0,08	4,33	0,02	
	3,91	0,02	12,37	0,15	6,44	0,01	4,49	0,02	
	4,47	0,01	12,27	0,01	6,70	0,05	4,40	0,02	
	4,69	0,03	12,16	0,23	7,34	0,08	4,56	0,03	
	5,28	0,13	12,06	0,12	7,87	0,01	4,72	0,01	
	5,60	0,05	12,08	0,12					

$w_2$  = fração mássica de etanol em água livre de soluto;  $u$  = incerteza experimental definida pela Equação 4.6.

Fonte: Autor

**Tabela D.15 – Dados experimentais de solubilidade da fenilglicina (1) em misturas de etanol (2) + água (3) à temperatura  $T = 15\text{ }^{\circ}\text{C}$  e pressão atmosférica  $p = 0,1013\text{ MPa}$** 

$w_2$	pH	$u(\text{pH})$	$m_1$ (mmolal)	$u(m_1)$ (mmolal)	$w_2$	pH	$u(\text{pH})$	$m_1$ (mmolal)	$u(m_1)$ (mmolal)
0,00	3,11	0,01	29,10	0,28	0,30	5,99	0,04	10,39	0,11
	3,48	0,01	28,13	0,06		6,37	0,01	10,41	0,09
	3,93	0,01	27,40	0,12		6,92	0,01	10,43	0,20
	4,44	0,01	27,06	0,18		7,38	0,01	10,52	0,05
	4,98	0,07	26,91	0,10		7,63	0,01	10,66	0,18
	5,55	0,03	26,77	0,08	0,50	2,94	0,01	11,62	0,03
	5,98	0,04	26,84	0,08		3,31	0,01	9,46	0,03
	6,48	0,01	26,88	0,16		3,83	0,01	8,25	0,23
	6,81	0,01	27,04	0,15		4,27	0,01	7,71	0,05
	7,48	0,02	27,50	0,06		4,79	0,01	7,56	0,01
0,10	7,91	0,01	28,20	0,11	5,10	0,01	7,54	0,18	
	2,67	0,01	20,62	0,15	0,70	5,89	0,02	7,48	0,05
	3,19	0,01	19,07	0,18		6,14	0,01	7,54	0,07
	3,53	0,01	18,65	0,06		6,67	0,06	7,58	0,15
	4,10	0,01	18,25	0,04		7,20	0,01	7,65	0,03
	4,62	0,01	18,11	0,10		7,54	0,01	7,69	0,13
	5,35	0,01	18,12	0,07	2,98	0,01	9,37	0,05	
	5,80	0,05	18,13	0,10	3,35	0,01	6,50	0,08	
	6,51	0,04	18,18	0,10	3,85	0,01	4,92	0,08	
	7,08	0,01	18,55	0,19	4,37	0,02	4,68	0,15	
7,48	0,04	18,99	0,07	4,75	0,01	4,46	0,06		
0,30	2,85	0,01	12,98	0,01	5,16	0,03	4,35	0,21	
	3,21	0,01	11,48	0,08	5,75	0,07	4,22	0,11	
	3,66	0,01	10,56	0,12	6,30	0,06	4,20	0,07	
	4,36	0,01	10,43	0,09	6,89	0,07	4,20	0,11	
	4,77	0,01	10,39	0,07	7,53	0,05	4,18	0,08	
	5,33	0,01	10,41	0,07	7,93	0,06	4,33	0,12	

$w_2$  = fração mássica de etanol em água livre de soluto;  $u$  = incerteza experimental definida pela Equação 4.6.

Fonte: Autor

**Tabela D.16 – Dados experimentais de solubilidade da fenilglicina (1) em misturas de etanol (2) + água (3) à temperatura  $T = 10\text{ }^{\circ}\text{C}$  e pressão atmosférica  $p = 0,1013\text{ MPa}$** 

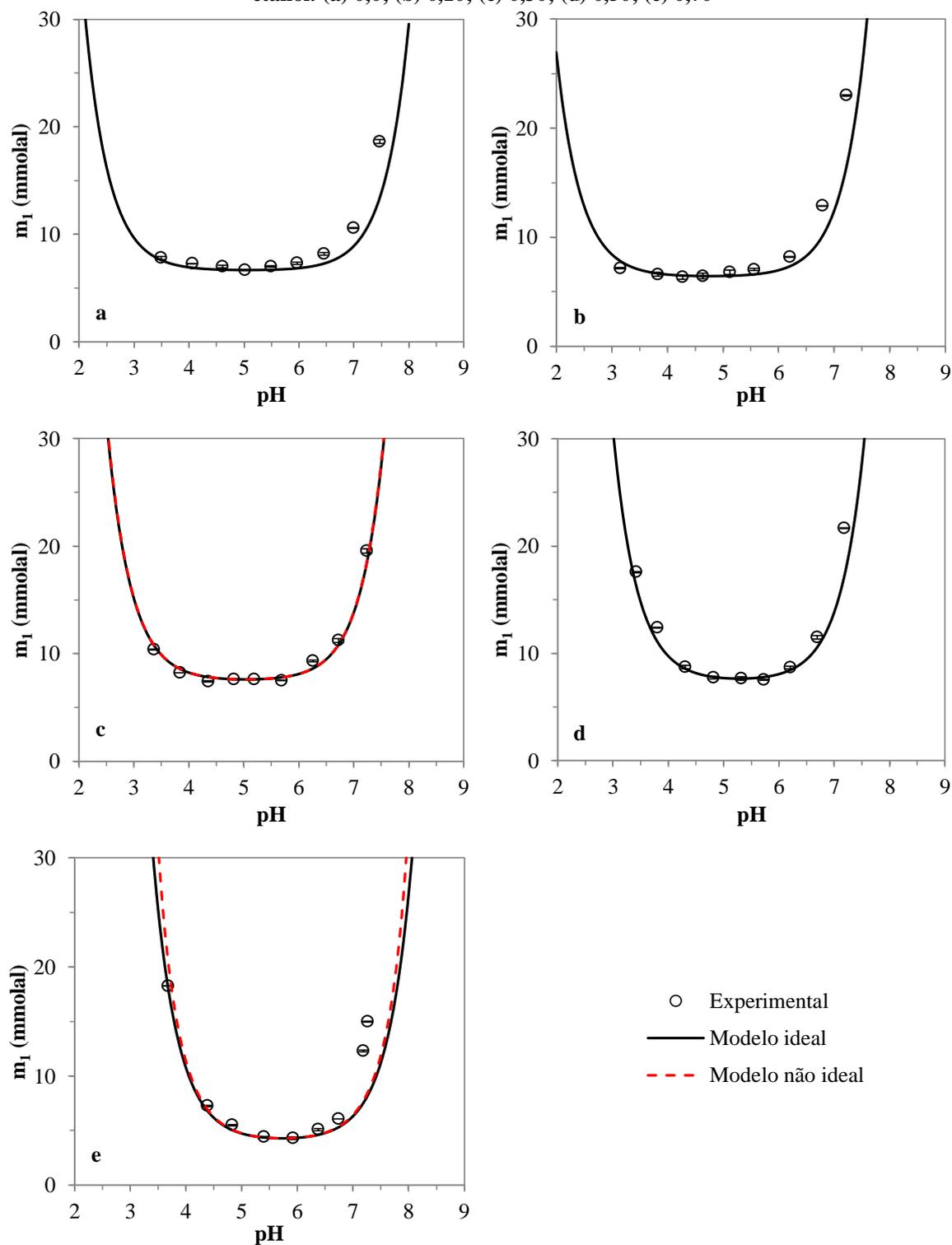
$w_2$	pH	$u(\text{pH})$	$m_1$ (mmolal)	$u(m_1)$ (mmolal)	$w_2$	pH	$u(\text{pH})$	$m_1$ (mmolal)	$u(m_1)$ (mmolal)
0,00	2,80	0,02	28,98	0,16	0,30	4,97	0,01	8,59	0,04
	3,29	0,01	27,58	0,04		5,77	0,02	8,60	0,05
	3,77	0,03	26,81	0,09		6,35	0,12	8,61	0,08
	4,48	0,01	26,15	0,01		7,08	0,08	8,60	0,07
	5,06	0,06	26,00	0,21		7,50	0,01	8,75	0,10
	5,94	0,06	26,13	0,03	0,50	2,93	0,01	10,52	0,05
	6,31	0,11	26,23	0,05		3,32	0,02	8,46	0,02
	7,21	0,10	26,39	0,06		3,72	0,01	7,24	0,16
	7,45	0,04	26,61	0,01		4,19	0,01	6,89	0,20
	8,17	0,02	27,77	0,05		4,58	0,03	6,79	0,18
0,10	2,60	0,04	19,59	0,12	0,70	5,14	0,01	6,75	0,01
	3,22	0,02	17,78	0,06		5,86	0,02	6,70	0,04
	3,73	0,01	17,46	0,08		6,52	0,06	6,64	0,10
	4,23	0,01	17,35	0,04		7,16	0,04	6,69	0,13
	4,69	0,01	17,36	0,09		7,97	0,06	6,86	0,03
	5,19	0,01	17,30	0,14	3,10	0,01	8,08	0,05	
	5,53	0,06	17,34	0,05	3,42	0,01	5,83	0,05	
	6,12	0,06	17,38	0,08	3,96	0,01	4,22	0,11	
	6,51	0,07	17,57	0,22	4,40	0,04	3,79	0,12	
	7,00	0,05	17,61	0,05	4,68	0,01	3,71	0,06	
7,54	0,01	18,11	0,09	5,27	0,01	3,72	0,03		
0,30	2,94	0,01	10,86	0,14	5,81	0,09	3,72	0,10	
	3,30	0,01	9,79	0,06	6,24	0,01	3,65	0,07	
	3,74	0,01	9,13	0,11	6,79	0,01	3,82	0,10	
	4,45	0,03	8,71	0,05	7,30	0,01	3,73	0,03	
	4,73	0,13	8,63	0,18	8,07	0,03	3,79	0,15	
	4,73	0,03	8,66	0,06					

$w_2$  = fração mássica de etanol em água livre de soluto;  $u$  = incerteza experimental definida pela Equação 4.6.

Fonte: Autor

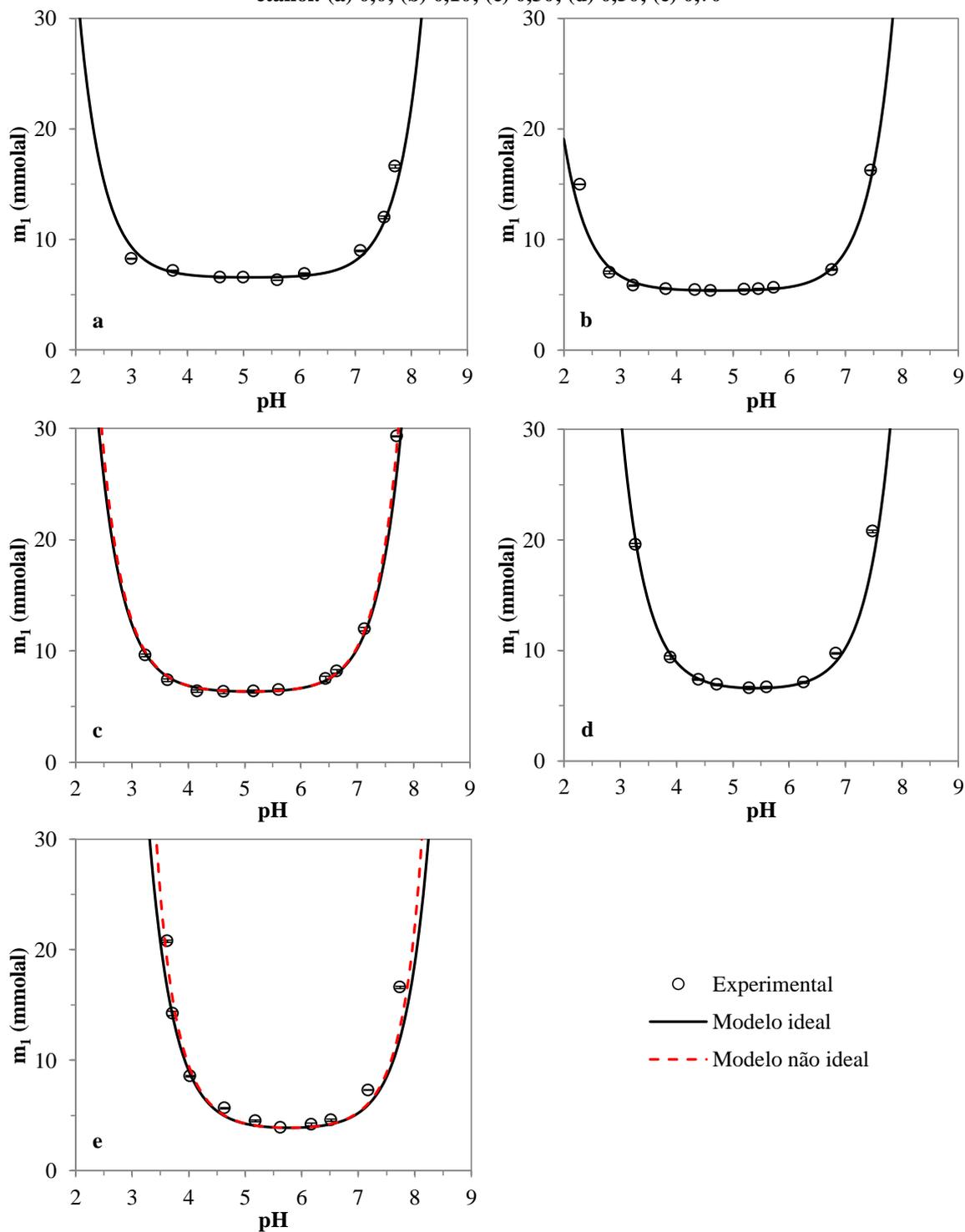
## APÊNDICE E – CORRELAÇÃO DOS RESULTADOS EXPERIMENTAIS DE SOLUBILIDADE

Figura E.1 – Curvas de solubilidade da amoxicilina a 25 °C, em função do pH e diferentes composições de etanol: (a) 0,0; (b) 0,10; (c) 0,30; (d) 0,50; (e) 0,70



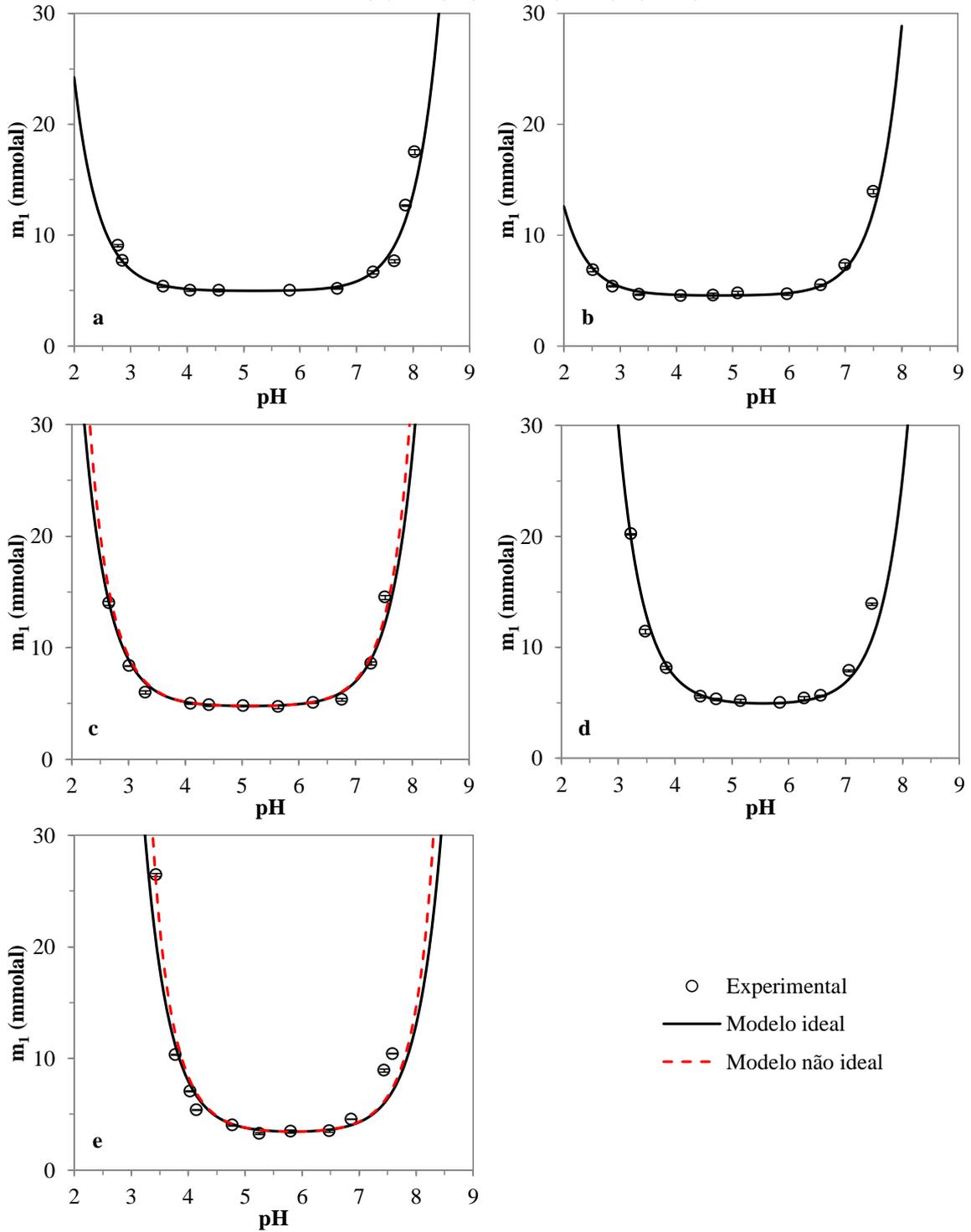
Fonte: Autor.

**Figura E.2 – Curvas de solubilidade da amoxicilina a 20 °C, em função do pH e diferentes composições de etanol: (a) 0,0; (b) 0,10; (c) 0,30; (d) 0,50; (e) 0,70**



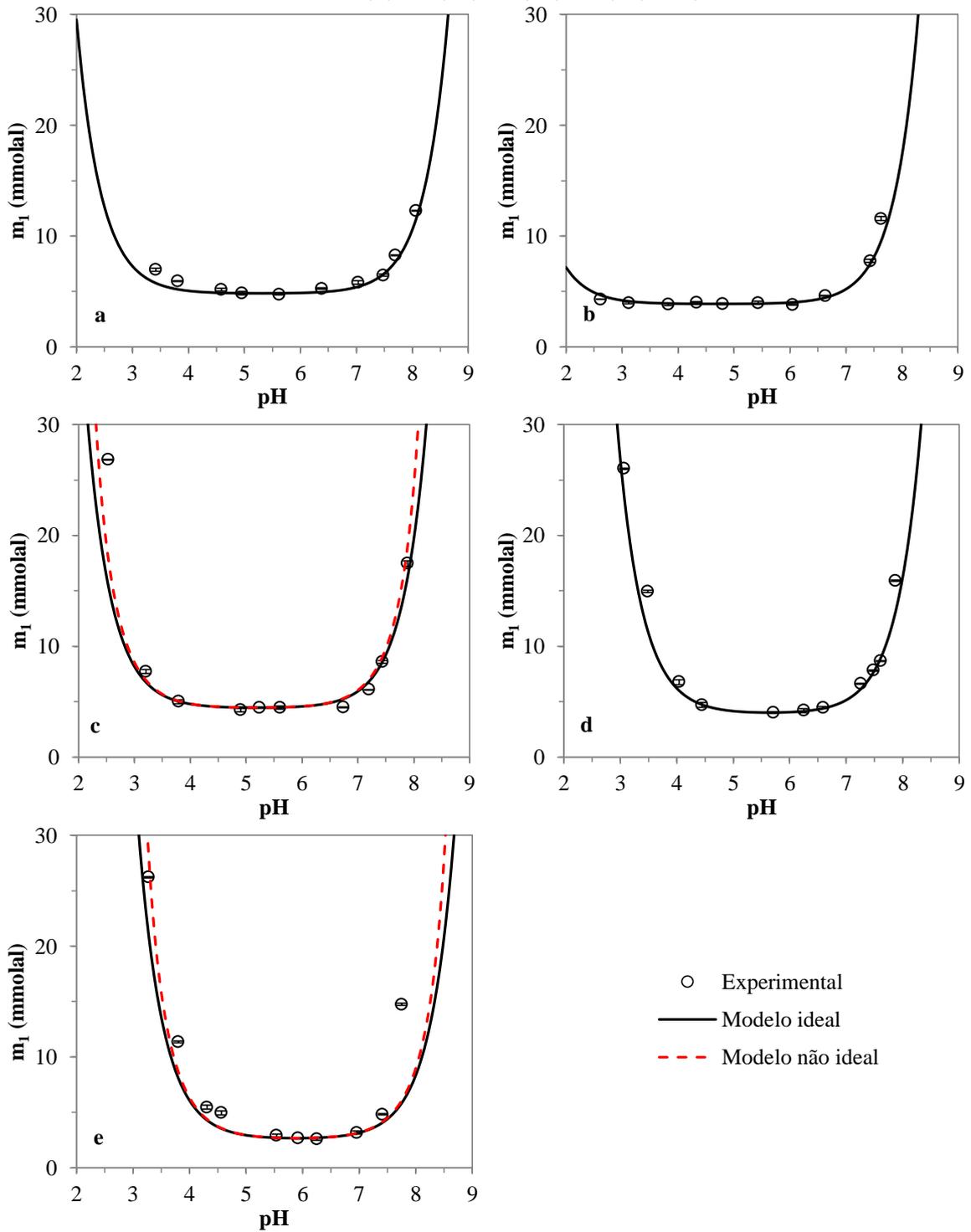
Fonte: Autor.

**Figura E.3 – Curvas de solubilidade da amoxicilina a 15 °C, em função do pH e diferentes composições de etanol: (a) 0,0; (b) 0,10; (c) 0,30; (d) 0,50; (e) 0,70**



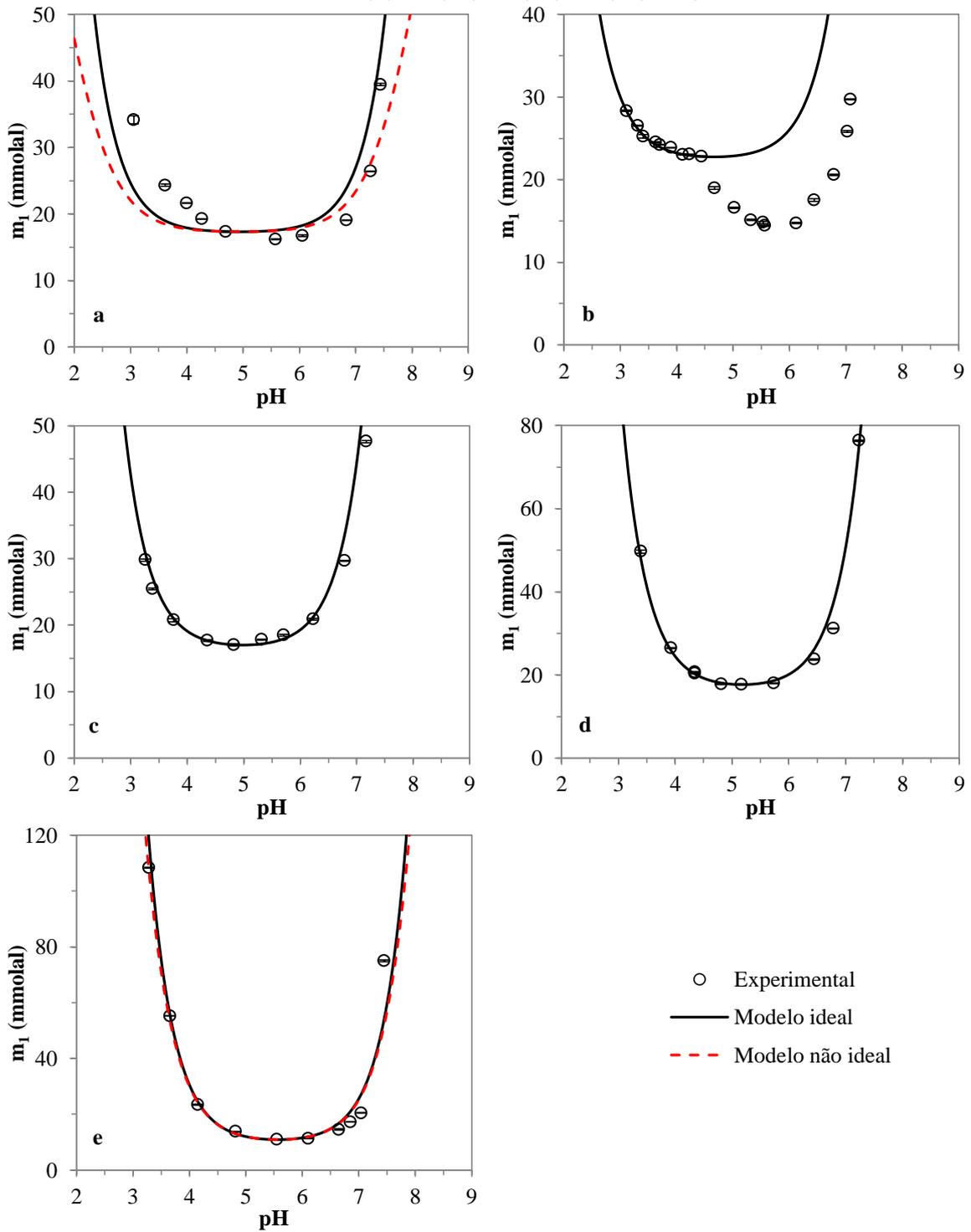
Fonte: Autor.

Figura E.4 – Curvas de solubilidade da amoxicilina a 10 °C, em função do pH e diferentes composições de etanol: (a) 0,0; (b) 0,10; (c) 0,30; (d) 0,50; (e) 0,70



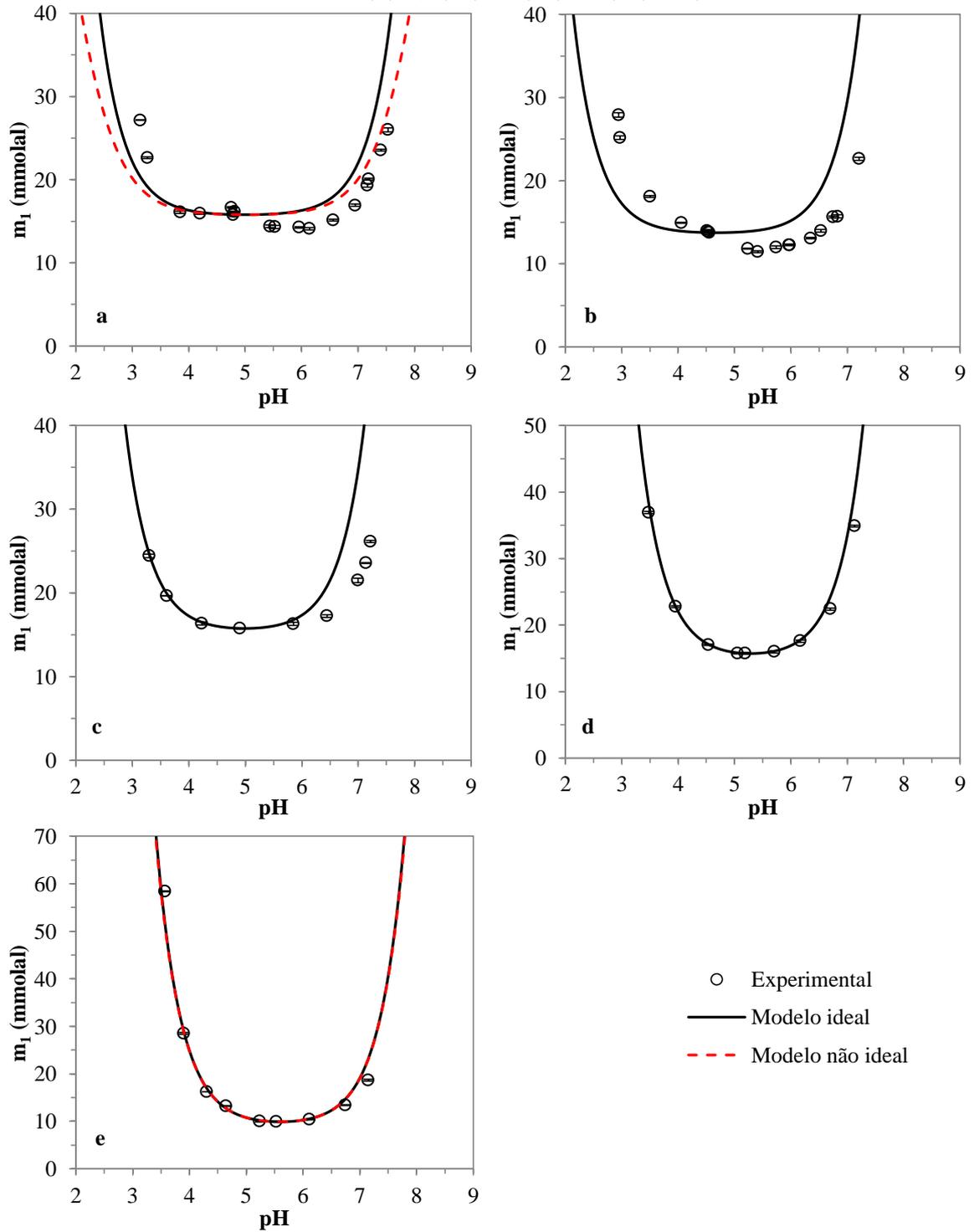
Fonte: Autor.

**Figura E.5 – Curvas de solubilidade da ampicilina a 25 °C, em função do pH e diferentes composições de etanol: (a) 0,0; (b) 0,10; (c) 0,30; (d) 0,50; (e) 0,70**



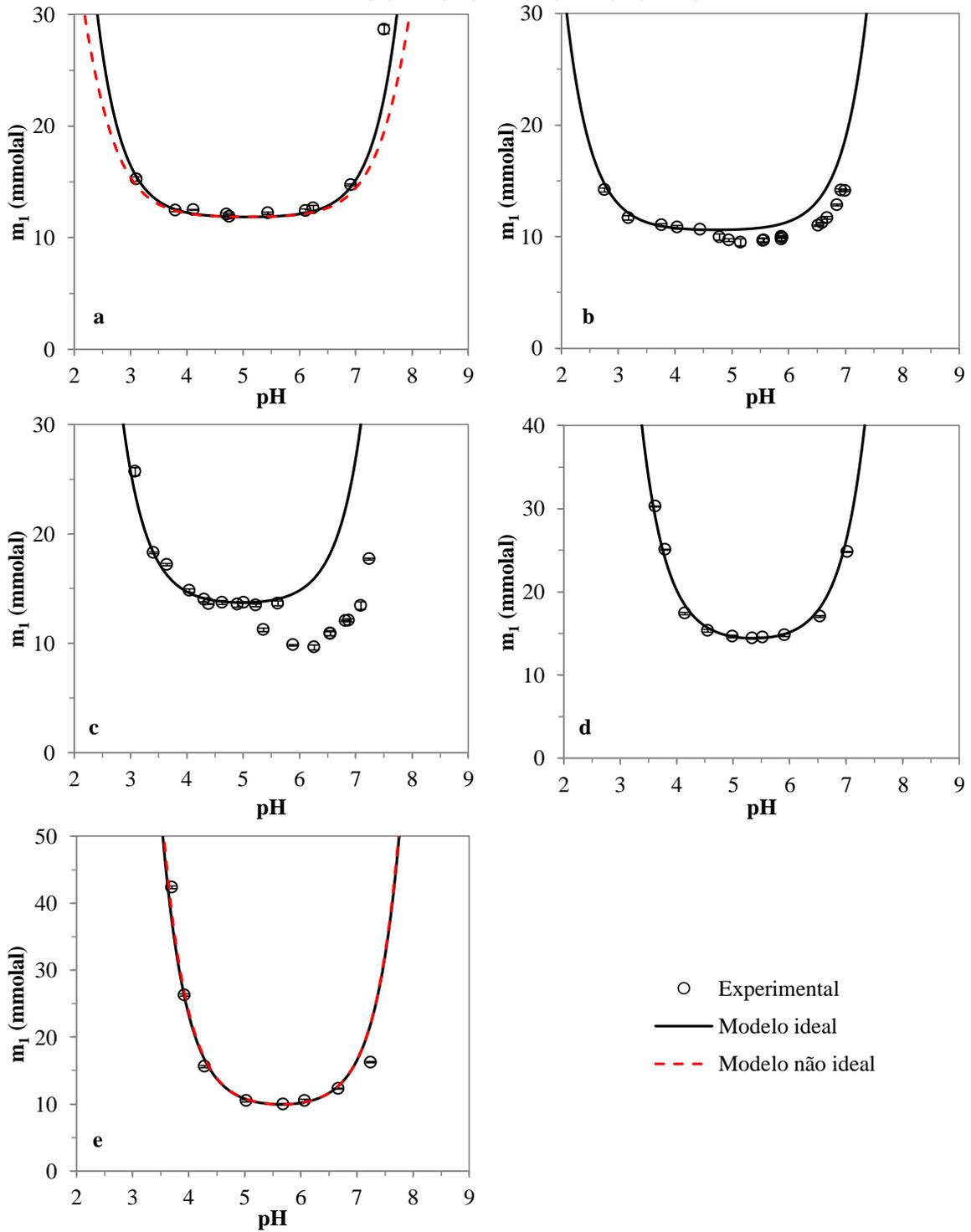
Fonte: Autor.

**Figura E.6 – Curvas de solubilidade da ampicilina a 20 °C, em função do pH e diferentes composições de etanol: (a) 0,0; (b) 0,10; (c) 0,30; (d) 0,50; (e) 0,70**



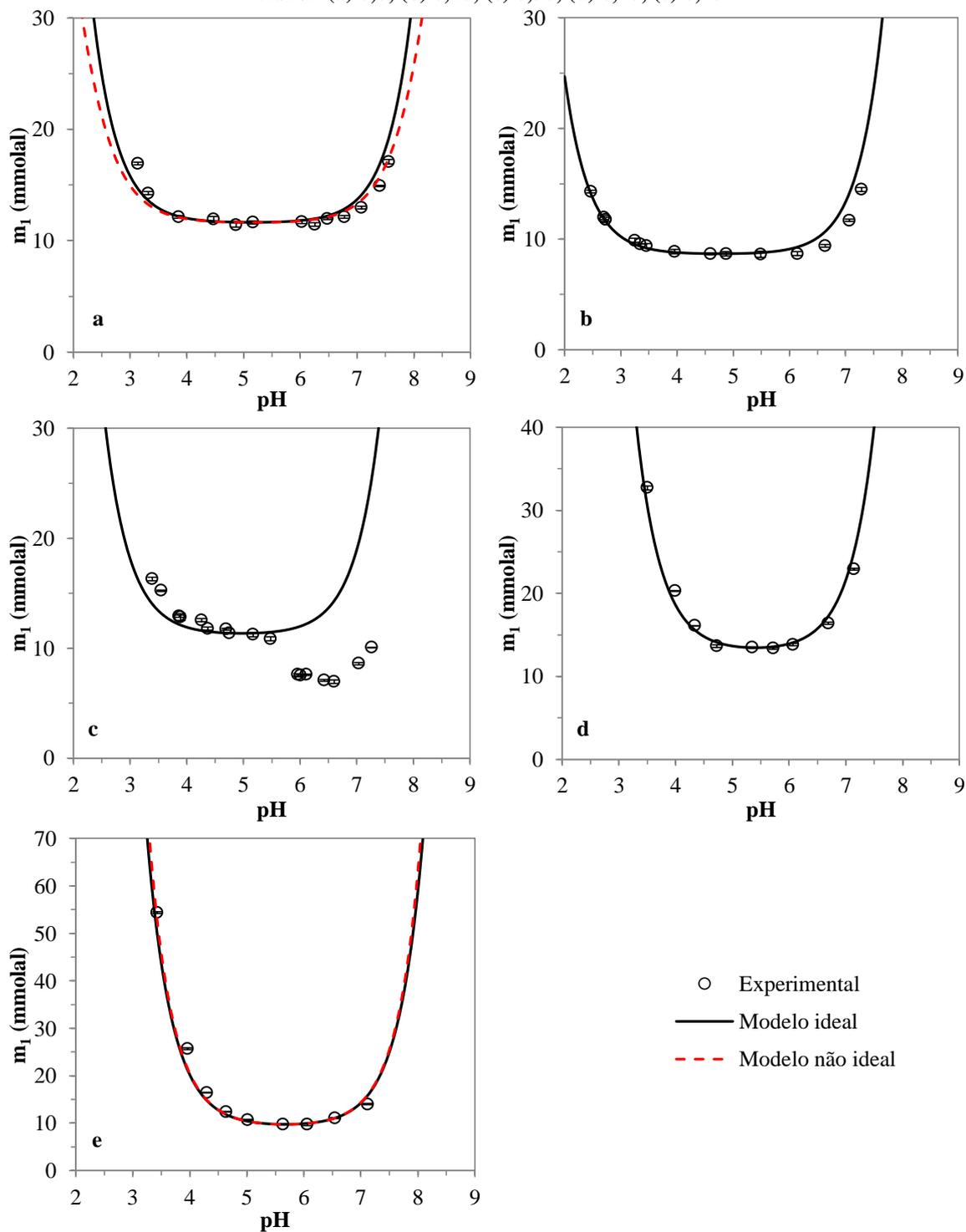
Fonte: Autor.

**Figura E.7 – Curvas de solubilidade da ampicilina a 15 °C, em função do pH e diferentes composições de etanol: (a) 0,0; (b) 0,10; (c) 0,30; (d) 0,50; (e) 0,70**



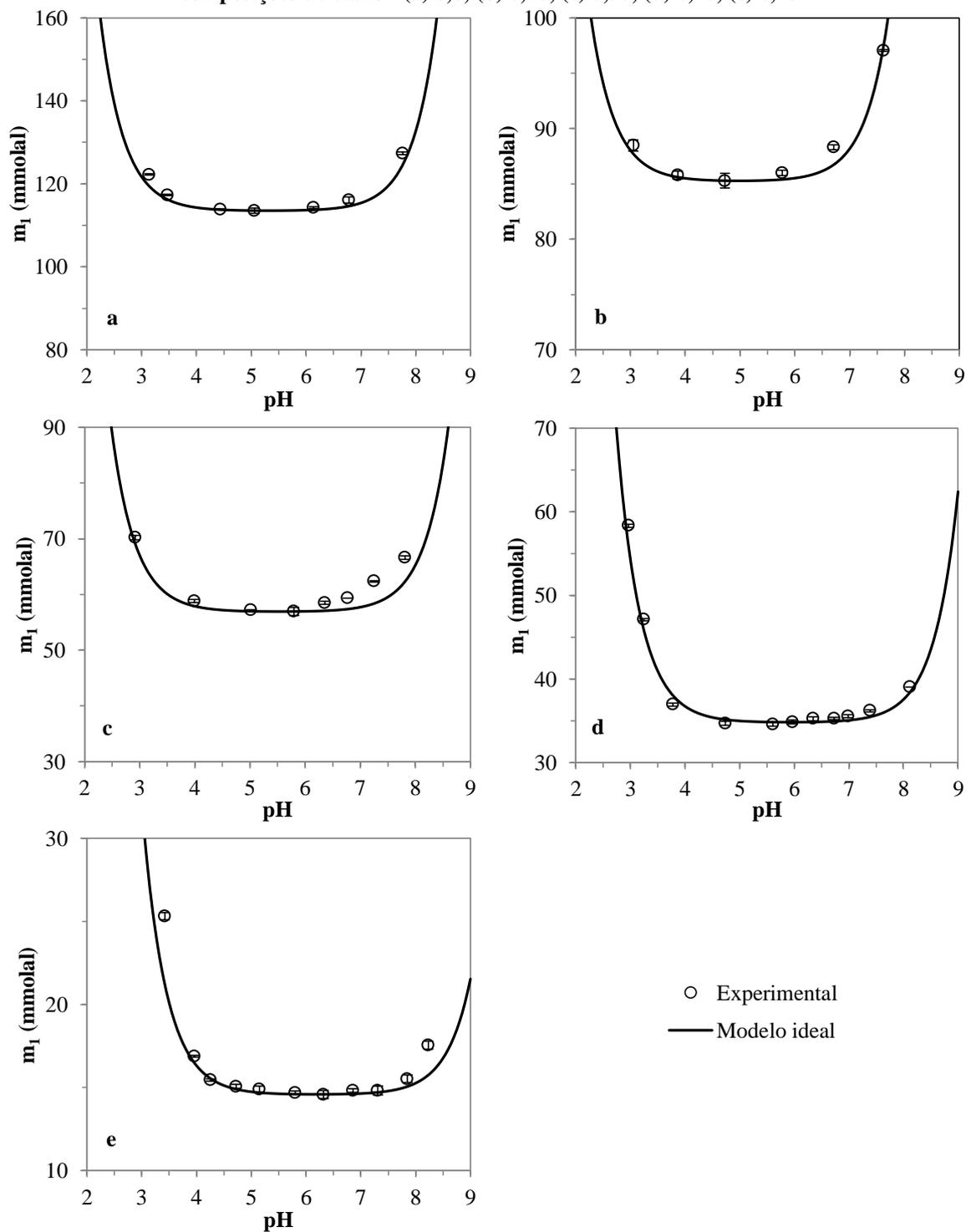
Fonte: Autor.

**Figura E.8 – Curvas de solubilidade da ampicilina a 10 °C, em função do pH e diferentes composições de etanol: (a) 0,0; (b) 0,10; (c) 0,30; (d) 0,50; (e) 0,70**



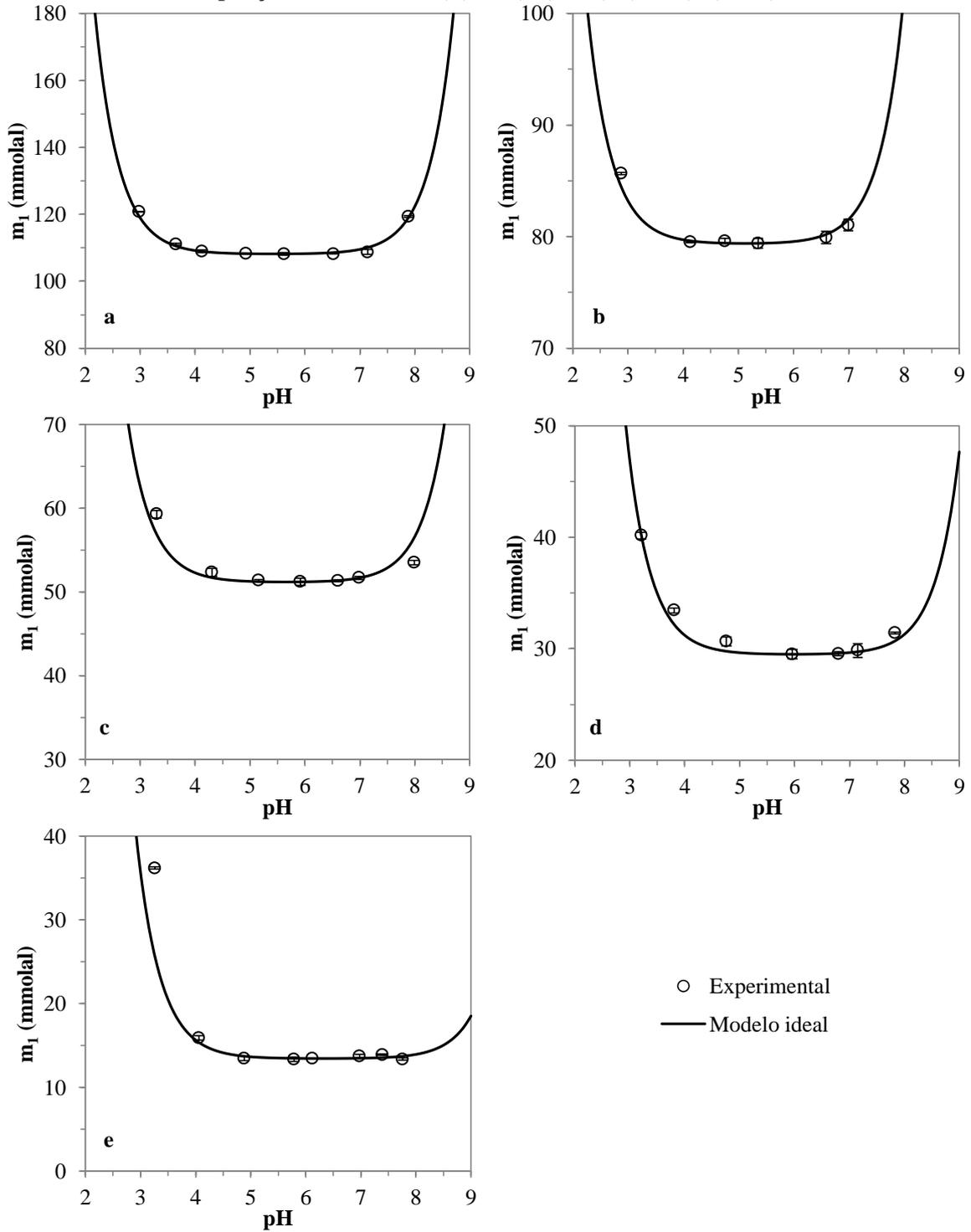
Fonte: Autor.

**Figura E.9 – Curvas de solubilidade da hidroxifenilglicina a 25 °C, em função do pH e diferentes composições de etanol: (a) 0,0; (b) 0,10; (c) 0,30; (d) 0,50; (e) 0,70**



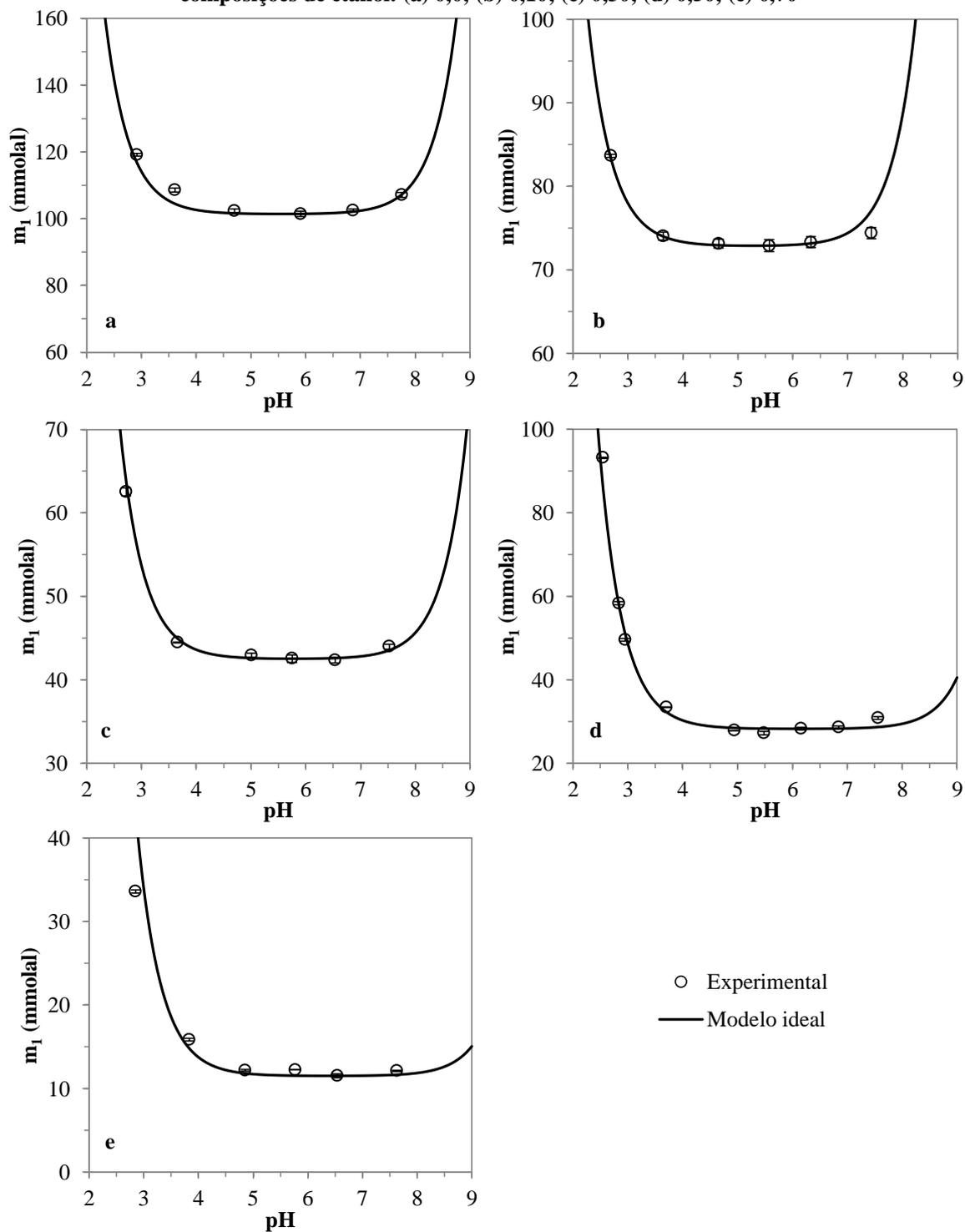
Fonte: Autor.

**Figura E.10 – Curvas de solubilidade da hidroxifenilglicina a 20 °C, em função do pH e diferentes composições de etanol: (a) 0,0; (b) 0,10; (c) 0,30; (d) 0,50; (e) 0,70**



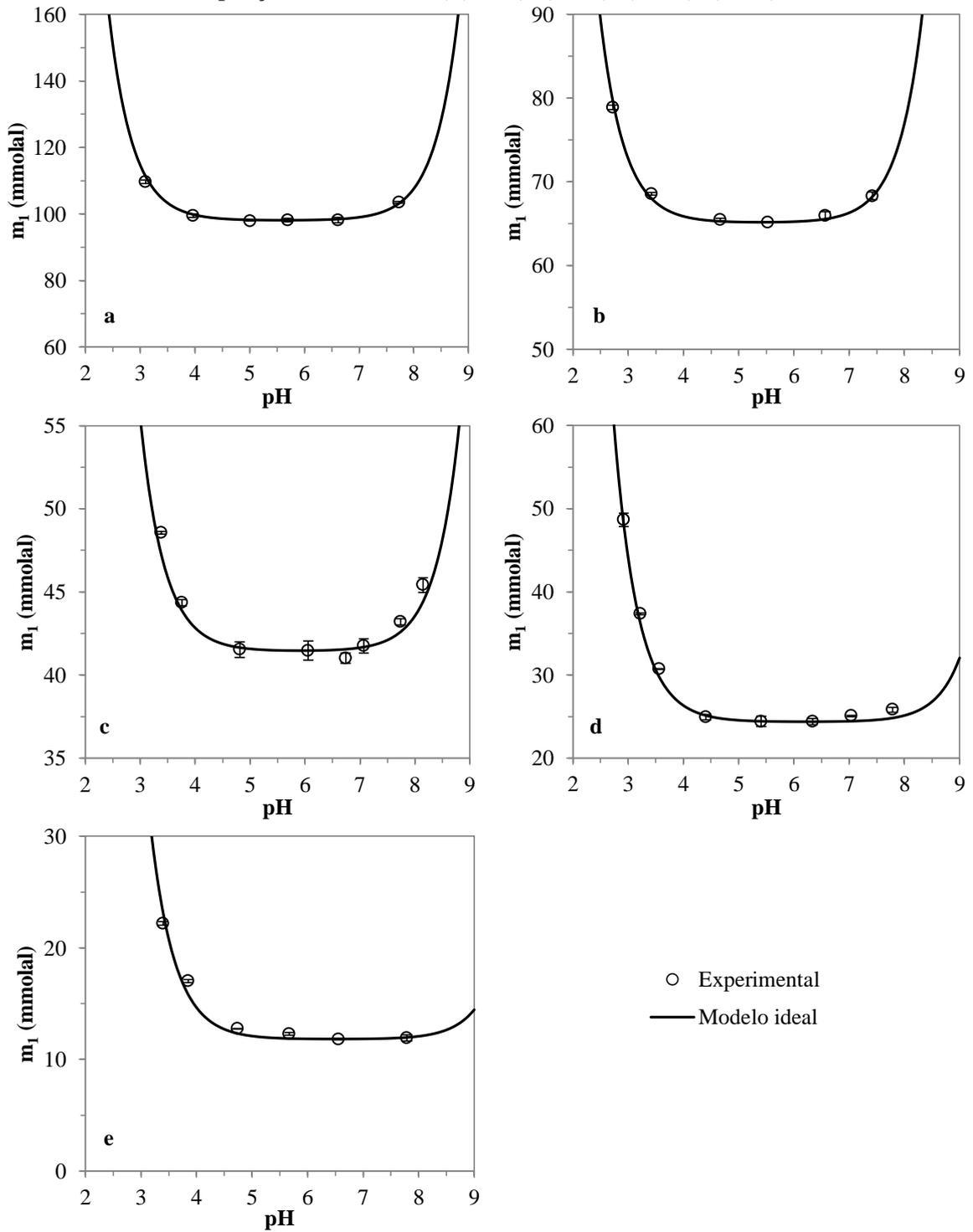
Fonte: Autor.

**Figura E.11 – Curvas de solubilidade da hidroxifenilglicina a 15 °C, em função do pH e diferentes composições de etanol: (a) 0,0; (b) 0,10; (c) 0,30; (d) 0,50; (e) 0,70**



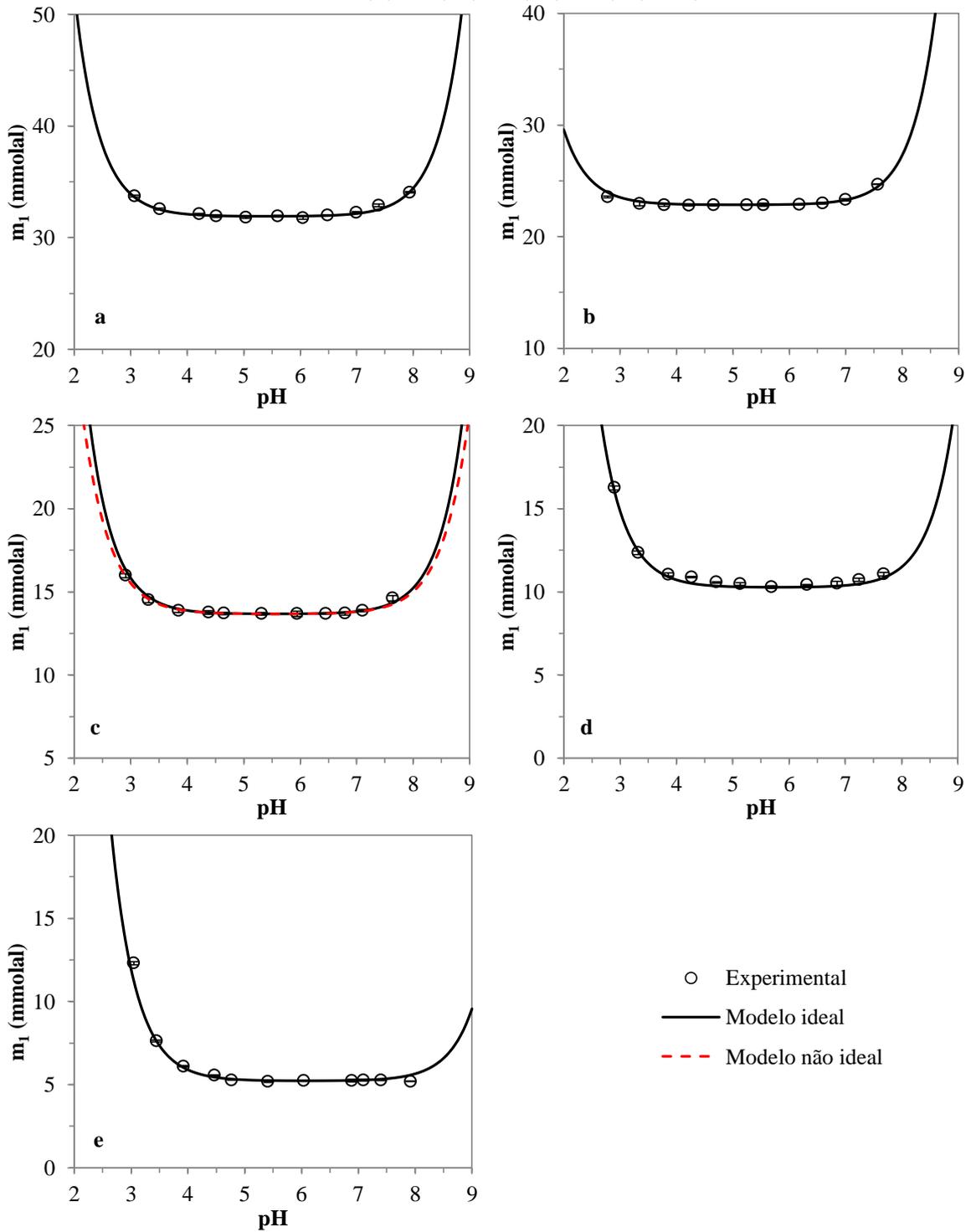
Fonte: Autor.

**Figura E.12 – Curvas de solubilidade da hidroxifenilglicina a 10 °C, em função do pH e diferentes composições de etanol: (a) 0,0; (b) 0,10; (c) 0,30; (d) 0,50; (e) 0,70**



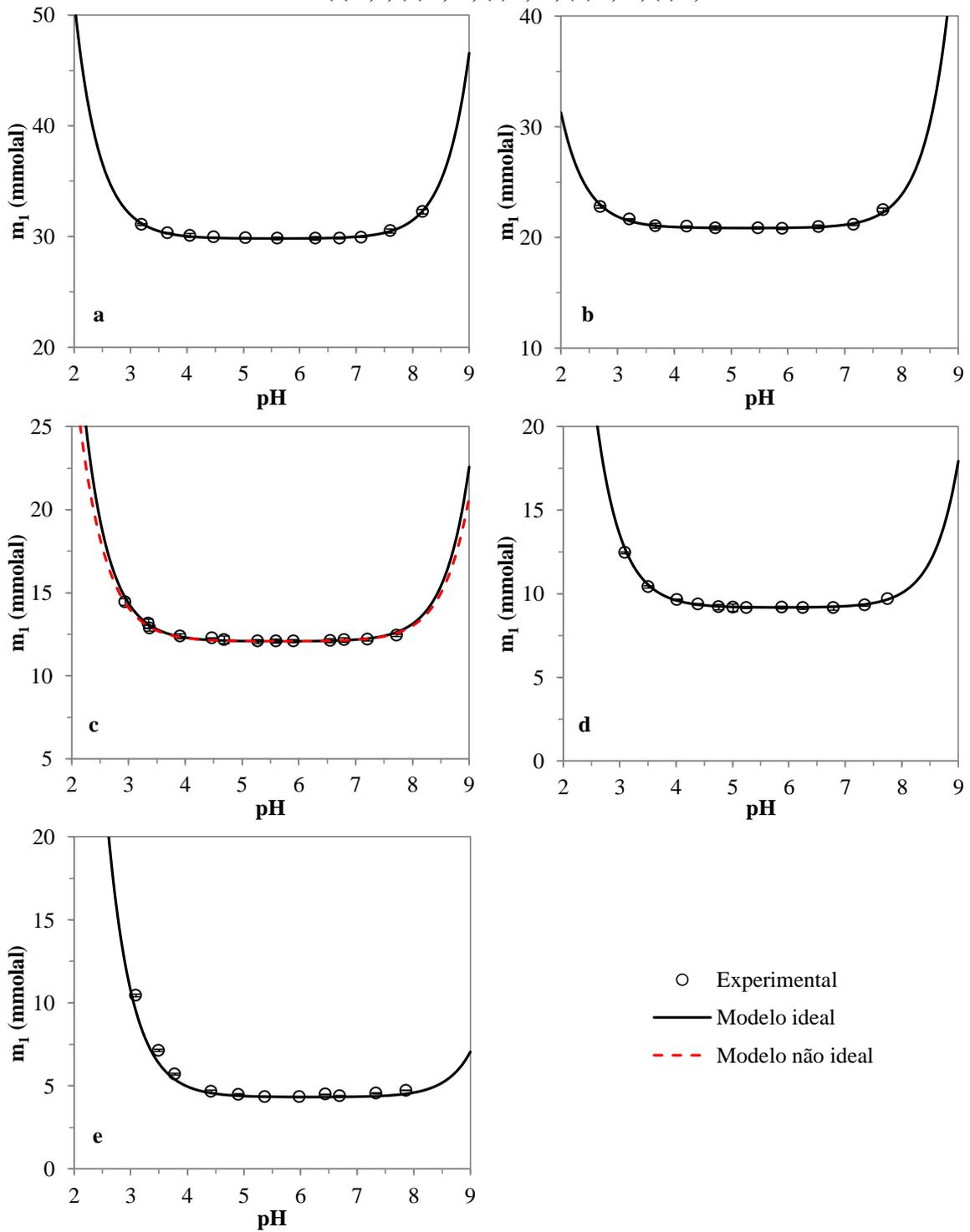
Fonte: Autor.

Figura E.13 – Curvas de solubilidade da fenilglicina a 25 °C, em função do pH e diferentes composições de etanol: (a) 0,0; (b) 0,10; (c) 0,30; (d) 0,50; (e) 0,70



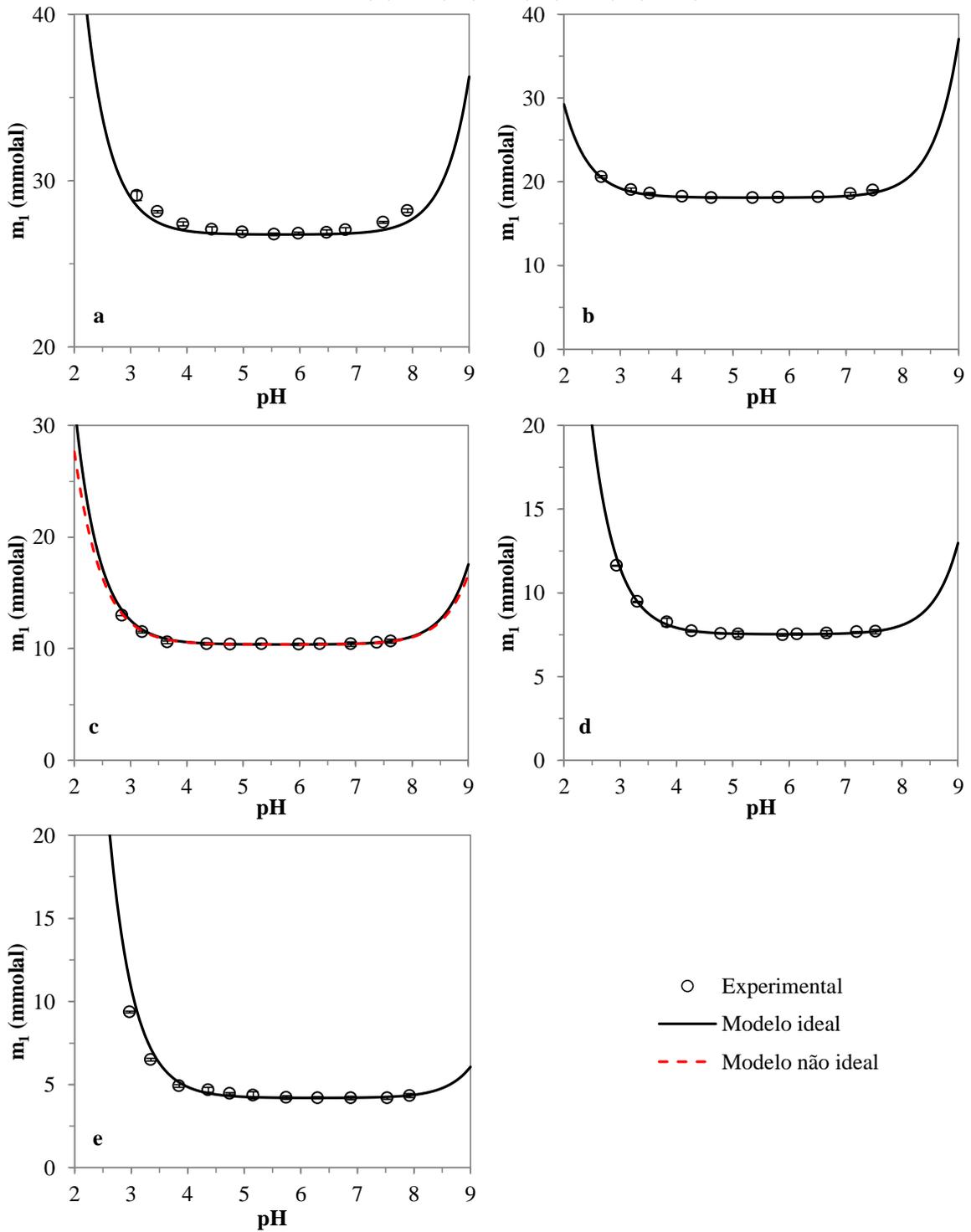
Fonte: Autor.

Figura E.14 – Curvas de solubilidade da fenilglicina a 20 °C, em função do pH e diferentes composições de etanol: (a) 0,0; (b) 0,10; (c) 0,30; (d) 0,50; (e) 0,70



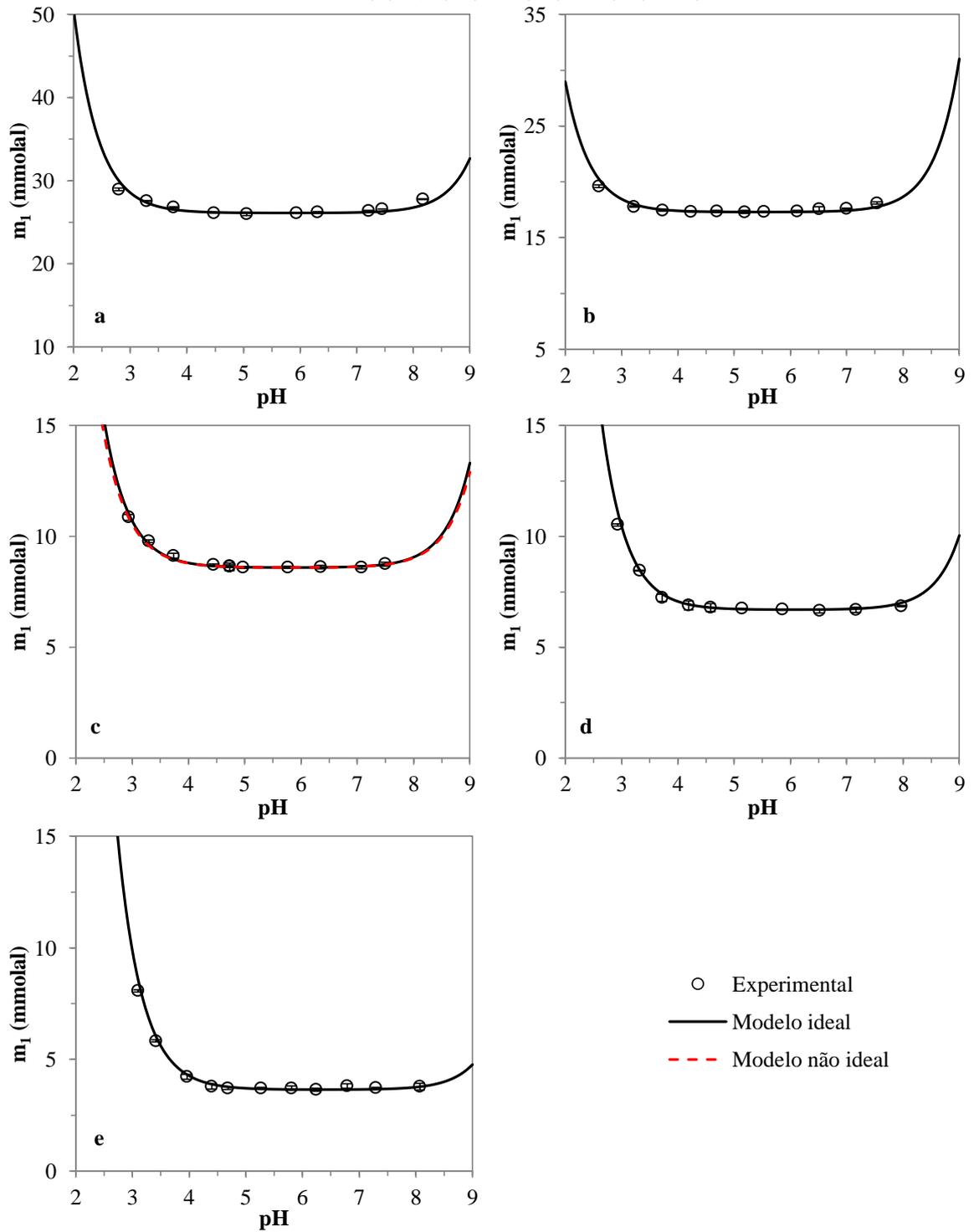
Fonte: Autor.

Figura E.15 – Curvas de solubilidade da fenilglicina a 15 °C, em função do pH e diferentes composições de etanol: (a) 0,0; (b) 0,10; (c) 0,30; (d) 0,50; (e) 0,70



Fonte: Autor.

Figura E.16 – Curvas de solubilidade da fenilglicina a 10 °C, em função do pH e diferentes composições de etanol: (a) 0,0; (b) 0,10; (c) 0,30; (d) 0,50; (e) 0,70



Fonte: Autor.