UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica
Área de Tecnologia de Fermentações

Extração líquido-líquido de ácido clavulânico empregando sistemas
micelares mistos de duas fases aquosas

Valéria de Carvalho Santos

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:
Prof. Dr. Adalberto Pessoa Junior

São Paulo
Março/2009

Valéria de Carvalho Santos

Extração líquido-líquido de ácido clavulânico empregando sistemas
mistos de duas fases aquosas

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Prof. Dr. Adalberto Pessoa Junior
orientador/presidente

Profa. Dra. Francislene Andréia Hasmann
1º. examinador

Prof. Dr. João Carlos Monteiro de Carvalho
2º. examinador

São Paulo, 06 de março de 2009.

Universidade de São Paulo

Janus

RELATÓRIO DE DEFESA

Aluno: 9134 - 5785350 - 1 / Página 1 de 1

Relatório de defesa pública de Dissertação do(a) Senhor(a) Valéria de Carvalho Santos no Programa: Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica, do(a) Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

Aos 06 dias do mês de março de 2009, Auditório do Bloco 13A realizou-se a Defesa da Dissertação do(a) Senhor(a) Valéria de Carvalho Santos, apresentada para a obtenção do título de Mestre intitulada:

"Extração líquido-líquido de ácido clavulânico empregando sistemas micelares mistos de duas fases aquosas"

Após declarada aberta a sessão, o(a) Sr(a) Presidente passa a palavra ao candidato para exposição e a seguir aos examinadores para as devidas arguições que se desenvolvem nos termos regimentais. Em seguida, a Comissão Julgadora proclama o resultado:

Nome dos Participantes da Banca	Função	Sigla da Unidade	Resultado
Adalberto Pessoa Junior	Presidente	FCF - USP	Aprovado
Joao Carlos Monteiro de Carvalho	Titular	FCF - USP	Aprovado
Francislene Andreia Hasmann	Titular	IAL - Externo	Aprovado

Resultado Final:

Parecer da Comissão Julgadora *

Eu, Mirian Bernardes Lopes Alves, lavrei a presente ata, que assino juntamente com os(as) Senhores(as). São Paulo, aos 06 dias do mês de março de 2009.

João Carlos Monteiro de Carvalho

Francislene Andreia Hasmann

Adalberto Pessoa Junior
Presidente da comissão julgadora

* Obs: Se o candidato for reprovado por algum dos membros, o preenchimento do parecer é obrigatório.

O título foi homologado pela Comissão de Pós-Graduação em 06/03/2009 e, portanto, o(a) aluno(a) faz jus ao título de Mestre em Tecnologia Bioquímico obtido no Programa Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica - Área de concentração: Tecnologia de Fermentações.

Presidente da Comissão de Pós-Graduação

“O conhecimento é orgulhoso por ter aprendido tanto;
a sabedoria é humilde por não saber mais.”
William Cowper

A minha mãe que sempre foi o meu maior exemplo de caráter, amizade, responsabilidade,
sabedoria e sobretudo amor.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Adalberto Pessoa Junior pela orientação, confiança, apoio, incentivo e disponibilidade sempre apresentada em todos os momentos de desenvolvimento deste trabalho.

À Professora Inês Conceição Roberto que me orientou durante a iniciação científica e sempre se mostrou muito prestativa.

À Professora Francislene Andréia Hasmann, que além de uma profissional excepcional é uma amiga muito querida sempre presente em todos os momentos da minha vida, que me ajudou a despertar o amor pela pesquisa e me auxiliou na análise estatística dos dados deste trabalho.

À Professora Carlota Rangel-Yagui, pela colaboração, participação, sugestão e disposição sempre apresentada a ajudar e auxiliar nas várias dúvidas surgidas durante o desenvolvimento deste trabalho.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro.

Ao André, por todo o apoio, incentivo e ajuda na realização dos experimentos e pela amizade que surgiu durante todo esse período. Obrigada por rir das minhas piadas.

À companheira e sempre amiga Daniela Viana, que me ajudou desde os primeiros experimentos e mesmo de longe sempre me auxiliou. Obrigada por todas as dicas, incentivos e, principalmente, pela amizade.

Aos amigos do semi industrial em especial, à Raquel, Marcelo, Lívia, Letícia, Angela, pela força, carinho e amizade durante todo esse período.

Aos funcionários da Secretaria de Pós-Graduação, Elaine, Jorge e Suzi, agradeço o carinho, esforço e eficiência.

Aos amigos que passaram durante esse dois anos de mestrado: Professor Hans-Olof Johansson, Jorge Fernando Brandão Pereira (amigo de todos os momentos), Bruno Rosso e Hector.

Aos professores do Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica, sobretudo os do semi-industrial.

Aos funcionários do Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica Miriam, Elza, Juarez, Ricardo, Gledson, Irene, Graça, Candida, Sônia, Ivani, que sempre foram muito atenciosos e ajudaram no que foi preciso.

Aos demais amigos da USP, Cínthia Hoch, Priscila Mazzola, Luis Carlos, Marina, Luciana, Carol, Laura, Gabriel, Renata, Flávio, Silgia, Sirlene, Ivan, Ana, Elias, Leonardo Dias e Cintia Baptistucci.

À Raquel Haga que me ajudou em muitos experimentos.

Ao professor Atílio pela cooperação, ajuda e participação no desenvolvimento de trabalhos.

Aos amigos da Escola de Engenharia de Lorena que mesmo de longe sempre estiveram comigo, principalmente, Joseana, Daniela Gurpilhares, Kátia, Isabel, Leandra, Carolina e Camila.

À minha família que sempre me apoiou e auxiliou incondicionalmente, principalmente, minha mãe, meus irmãos (Paulo e Rafael), meus sobrinhos (Victor e Mayara) e minha cunhada Adriana.

Ao Gustavo, pelo amor, sinceridade, amizade, apoio e incentivo,..., algumas coisas não podem ser expressas em palavras.

Agradeço por tudo e por todos que me ajudaram de alguma forma neste trabalho.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	vi
SUMÁRIO.....	viii
LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE TABELAS.....	xvi
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	xviii
RESUMO	xx
ABSTRACT.....	xxi
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	2
2.1. Antibióticos	2
2.2. Ácido Clavulânico	7
2.2.1. Estabilidade do Ácido Clavulânico.....	12
2.2.2. Processos de Purificação do Ácido Clavulânico.....	13
2.3. Processos de Separação e Purificação de Bioprodutos.....	16
2.3.1. Sistemas Micelares de Duas Fases Aquosas (SMDFA).....	17
3. OBJETIVOS	26
4. MATERIAIS E MÉTODOS	27
4.1. Materiais	27
4.2. Microrganismo.....	27
4.3. Meios de cultura.....	27
4.3.1. Meios de Esporulação, Manutenção e Reativação.....	27
4.3.2. Meio para Produção de Ácido Clavulânico	28
4.4. Métodos	29
4.4.1. Manutenção das Amostras.....	29
4.4.2. Condições de Cultivo	29
4.4.3. Estabilidade do Ácido Clavulânico em Diferentes pHs, Tipos e Concentração de Sais e Temperaturas.....	30
4.4.4. Estabilidade do Ácido Clavulânico na Presença dos Tensoativos Triton X-114, AOT e do Sistema Triton X-114/AOT.....	31
4.4.5. Construção das Curvas Binodais para os Sistemas Triton X-114/Tampão e Triton X-114/AOT/Tampão	32
4.4.6. Estudo da Influência do Meio Fermentado na Curva Binodal do Sistema Misto Triton X-114/AOT/Tampão	33
4.4.7. Partição de Ácido clavulânico no Sistema Triton X-114/AOT/Tampão.....	33
4.4.7.1. Estudos Iniciais	35
4.4.7.2. Planejamento Fatorial.....	36
4.4.7.3. Experimentos Seriados	37

4.5. Determinações Analíticas.....	39
4.5.1. Determinação da Concentração Celular	39
4.5.2. Determinação da Concentração de Ácido Clavulânico	39
4.5.3. Determinação da Concentração de Glicerol	40
4.5.4. Velocidades Específicas e Produtividade	40
4.5.5. Análise da Extração	41
Estatística	42
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	42
5.1. Obtenção de Ácido Clavulânico por Bioprocesso.....	42
5.2. Estabilidade do Ácido Clavulânico em Diferentes pHs e Temperaturas	51
5.3. Estabilidade do Ácido Clavulânico em Diferentes Tipos e Concentrações de Sais	53
5.4. Estabilidade do Ácido Clavulânico a Diferentes Temperaturas	56
5.5. Curvas Binodais para os Sistemas Triton X-114/Tampão	58
5.6. Curvas Binodais para os Sistemas Triton X-114/AOT/Tampão	61
5.7. Estabilidade do Ácido Clavulânico na Presença dos Tensoativos Triton X-114, AOT e do Sistema Triton X-114/AOT.....	65
5.8. Estudo da Influência do Meio Fermentado na Curva Binodal do Sistema Misto Triton X-114/AOT/Tampão	69
5.9. Partição de Ácido clavulânico no Sistema Triton X-114/AOT/Tampão.....	71
5.9.1. Estudos Iniciais.....	71
5.9.2 Planejamento Fatorial.....	74
5.9.3. Experimentos Seriados.....	81
6. CONCLUSÕES.....	87
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	89
Apêndice A	101
Apêndice B	102
Apêndice C	104
Anexo – Artigo aceito para publicação	105

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	Abertura hidrolítica do anel e desativação de (A) penicilinas, (B) cefalosporinas e (C) carbapenem por β -lactamases (Walsh, 2003).	6
FIGURA 2	Estrutura química do ácido clavulânico (Reading e Cole, 1977).	7
FIGURA 3	Reencaminhamento da acilo-enzima intermediária pelo ácido clavulânico para inativar β -lactamases (Walsh, 2003).	8
FIGURA 4	Esquema da biosíntese do ácido clavulânico e seus precursores mostrando o fluxo do carbono (Li e Townsend, 2006).	10
FIGURA 5	Exemplos de agentes tensoativos aniônico - Bis(2-etilhexil) sulfocinato de sódio (AOT) e não-iônico - polioxietileno <i>p-t</i> -octil fenol (Triton X-114).	18
FIGURA 6	Ilustração esquemática do equilíbrio termodinâmico reversível monômero-micela (baseado em Liu <i>et al.</i> , 1996). Micelas se formam em soluções aquosas com concentração de tensoativo acima da CMC, por meio de agregação dos monômeros com as porções apolares constituindo o interior micelar e protegidas do contato com a água, e as cabeças polares constituindo a superfície micelar em contato com a água.	19
FIGURA 7	Representação esquemática baseada no trabalho de Nikas <i>et al.</i> , (1992) de um sistema micelar de duas fases aquosas para o tensoativo não-iônico Triton X-114. O sistema exibe uma única fase a baixas temperaturas; com o aumento da temperatura, se separa em uma fase rica em micelas (fase concentrada) que coexiste com uma fase pobre em micelas (fase diluída).	22
FIGURA 8	Esquema da curva binodal de uma solução aquosa do tensoativo C ₁₀ E ₄ baseada no artigo de Liu <i>et al.</i> (1996). C_d = concentração do tensoativo na fase pobre em micelas; C_c = concentração do tensoativo na fase rica em micelas; V_c = comprimento do segmento de reta da linha de amarração (<i>tie-line</i>) compreendido entre C_d e o valor da concentração total do tensoativo no sistema antes da separação das fases (neste caso 4,12%) e cujo valor é proporcional ao volume da fase rica em micelas; V_d = comprimento do segmento de reta da linha de amarração compreendido entre C_c e o valor da concentração total do tensoativo no sistema antes da separação das fases (neste caso 4,12%) e cujo valor é proporcional ao volume da fase pobre em micelas.	23

FIGURA 9	Esquema do procedimento experimental para a extração por SMDFA. 1 - Tubo de ensaio graduado contendo todos os componentes do sistema: tampão, agentes tensoativos e ácido clavulânico – Sistema Monofásico; 2 – Homogeneização do tubo de ensaio durante 1 hora; 3 – Incubação do tubo contendo os componentes da extração à temperatura desejada (variação de $\pm 0,02^{\circ}\text{C}$) pelo tempo desejado em banho termorregulado; 4 – Tubo contendo as duas fases do sistema, coleta das fases com auxílio de seringa e agulha (no interior do banho) – Sistema Bifásico; 5 – Amostras contendo as fases concentrada e diluída para análises subsequentes da concentração de ácido clavulânico e determinação do coeficiente de partição (K_{AC}) e recuperação na fase diluída do sistema (η_{AC}).	35
FIGURA 10	Reação do ácido clavulânico com imidazol.	39
FIGURA 11	Perfis da concentração de glicerol (■), ácido clavulânico (◆) e biomassa (▲) para o meio F ₁ , sem a adição de NH ₄ Cl e extrato de levedura, descrito por Porto <i>et al.</i> (1996).	43
FIGURA 12	Perfis da concentração de glicerol (■), ácido clavulânico (◆) e biomassa (▲) para o meio F ₂ , modificado pela substituição da farinha de soja por extrato de farinha de soja, descrito por Ortiz <i>et al.</i> (2007).	44
FIGURA 13	Perfis da concentração de glicerol (■), ácido clavulânico (◆) e biomassa (▲) para o meio F ₃ , modificado do meio F ₂ pela substituição de óleo de soja por milhocina.	44
FIGURA 14	Perfis da concentração de glicerol e ácido clavulânico para os meios F ₁ , F ₂ e F ₃ ao longo do bioprocessamento. (■) F ₁ -glicerol; (◆) F ₁ -ácido clavulânico; (✱) F ₂ -glicerol; (●) F ₂ -ácido clavulânico; (▲) F ₃ -glicerol; (✱) F ₃ -ácido clavulânico.	47
FIGURA 15	Comportamento do pH ao longo do bioprocessamento nos meios F ₁ (■), F ₂ (▲) e F ₃ (◆).	48
FIGURA 16	Variação da velocidade específica de crescimento (μ_X -◆), de consumo de substrato (μ_S -■) e de produção de ácido clavulânico (μ_{AC} -▲) no tempo para o meio F ₁ , sem a adição de NH ₄ Cl e extrato de levedura, descrito por Porto <i>et al.</i> (1996), ao longo das 168 horas de bioprocessamento.	49

- FIGURA 17** Variação da velocidade específica de crescimento (μ_X -♦), de consumo de substrato (μ_S -■) e de produção de ácido clavulânico (μ_{AC} -▲) no tempo para o meio F₂, modificado do meio descrito por Ortiz *et al.* (2007) pela substituição da farinha de soja por extrato de farinha de soja, ao longo das 168 horas de bioprocesso. **49**
- FIGURA 18** Variação da velocidade específica de crescimento (μ_X -♦), de consumo de substrato (μ_S -■) e de produção de ácido clavulânico (μ_{AC} -▲) no tempo para o meio F₃, modificado do meio F₂ pela substituição de óleo de soja por milhocina, ao longo das 168 horas de bioprocesso. **50**
- FIGURA 19** Concentração de ácido clavulânico em Tampão Mcllvaine pH 6,5-30°C (▲), pH 6,5-45°C (◆), pH 7,2-30°C (×), pH 7,2-45°C (■) ao longo de 24 horas. As barras de erro correspondem a um intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos. **52**
- FIGURA 20** Concentração de ácido clavulânico em Tampão Mcllvaine pH 6,5 sem adição de sal (◆), NaCl 0,1 M (■), NaCl 0,5 M (▲), CaCl₂.2H₂O 0,1 M (×), CaCl₂.2H₂O 0,5 M (*), MgSO₄.7H₂O 0,1 M (●), MgSO₄.7H₂O 0,5 M (+) a 30°C ao longo de 24 horas. As barras de erro correspondem a um intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos. **54**
- FIGURA 21** Influência da força iônica na estabilidade do ácido clavulânico em Tampão Mcllvaine pH 6,5 a 30°C adicionado de diferentes tipos e concentrações de sais após 24 horas de reação (0,1 M (●) e 0,5 M (□)). **55**
- FIGURA 22** Concentração de ácido clavulânico em Tampão Mcllvaine pH 6,5 com NaCl 0,1 M a 15 (◆), 20 (■), 30 (▲) e 45°C (×) ao longo de 24 horas. As barras de erro correspondem a um intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos. **57**
- FIGURA 23** Curvas Binodais do sistema Triton X-114 na ausência de sais em água (◆), Tampão Mcllvaine pH 7,2 (■), Tampão Mcllvaine pH 6,5 (×) e em Tampão Mcllvaine pH 6,5 na presença de NaCl 0,1 M (*), NaCl 0,5 M (●), CaCl₂.2H₂O 0,1 M (◆), CaCl₂.2H₂O 0,5 M (▲), MgSO₄.7H₂O 0,05 M (■) e MgSO₄.7H₂O 0,25 M (◆). As barras de erro correspondem a um intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos. **58**
- FIGURA 24** Curvas binodais do sistema Triton X-114 em Tampão Mcllvaine pH 6,5: ausência de sal (▲); em presença de NaCl 0,05 M (×), NaCl 0,1 M (*), NaCl 0,5 M. As barras de erro correspondem a um intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos. **61**

- FIGURA 25** Influência da concentração de AOT na curva binodal em Tampão McIlvaine pH 6,5 do sistema misto Triton X-114/AOT na presença de diferentes concentrações de Triton X-114 (1%, ◆; 3%, ■; e 5% m/m, ▲). As barras de erro correspondem a um intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos. **62**
- FIGURA 26** Influência da concentração de AOT na curva binodal em Tampão McIlvaine pH 6,5/NaCl 0,05 M do sistema misto Triton X-114/AOT na presença de diferentes concentrações de Triton X-114 (1%, ◆; 3%, ■; e 5% m/m, ▲). As barras de erro correspondem a um intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos. **62**
- FIGURA 27** Influência da concentração de AOT na curva binodal em Tampão McIlvaine pH 6,5/NaCl 0,1 M do sistema misto Triton X-114/AOT na presença de diferentes concentrações de Triton X-114 (1%, ◆; 3%, ■; e 5% m/m, ▲). As barras de erro correspondem a um intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos. **63**
- FIGURA 28** Estabilidade do ácido clavulânico na presença de 0% (◆), 1% (■), 3% (▲), 5% (×), 7% (*) e 9% m/m (●) de Triton X-114 em Tampão McIlvaine pH 6,5/NaCl 0,1 M, durante 24 horas a 20°C. As barras de erro correspondem a um intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos. **66**
- FIGURA 29** Estabilidade do ácido clavulânico na presença de 0 (◆), 0,5 (■), 1 (●), 1,5 (▲), 2,5 (×) e 3,5 mM (*) de AOT em Tampão McIlvaine pH 6,5/NaCl 0,1M, durante 24 horas a 20°C. As barras de erro correspondem a um intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos. **67**
- FIGURA 30** Estabilidade do ácido clavulânico na presença concomitante de Triton X-114 (%)/AOT (mM) em Tampão McIlvaine pH 6,5/NaCl 0,1 M durante 24 horas a 18°C. [0 / 0 (◆); 1 / 0,5 (■); 1 / 1,0 (▲); 5 / 0,5 (×); 5 / 1,0 (*)]. As barras de erro correspondem a um intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos. **68**
- FIGURA 31** Coeficientes de partição do ácido clavulânico comercial (K_{AC}) obtidos em sistemas mistos (Triton X-114 (3%)/AOT (variando)) de duas fases aquosas em Tampão McIlvaine pH 6,5 sem adição de NaCl a 24,5°C após 3 horas de reação. As barras de erro correspondem a um intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos. **71**

- FIGURA 32** Coeficientes de partição do ácido clavulânico do meio fermentado (K_{AC}) obtidos em sistemas mistos (Triton X-114 (3%)/AOT (0,75 mM)) de duas fases aquosas a 24,5°C. As barras cinza e brancas correspondem aos tempos de 3 e 24 horas, respectivamente. As barras de erro correspondem a um intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos. 73
- FIGURA 33** Balanços de massa do ácido clavulânico do meio fermentado (BM_{AC}) obtidos em sistemas mistos (Triton X-114 (3%)/AOT (0,75 mM)) de duas fases aquosas a 24,5°C. As barras cinza e brancas correspondem aos tempos de 3 e 24 horas, respectivamente, e as barras de erro a um intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos. 73
- FIGURA 34** Coeficientes de partição do ácido clavulânico proveniente do meio fermentado (K_{AC}) obtidos em sistemas micelares mistos (Triton X-114/AOT (1 mM)) de duas fases aquosas em Tampão McIlvaine pH 6,5. As barras de erro correspondem a um intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos. 82
- FIGURA 35** Balanço de Massa (BM_{AC}) e recuperação do ácido clavulânico na fase diluída (η_{AC}) apresentadas pelas barras cinzas e brancas, respectivamente, obtidas em sistemas mistos (Triton X-114/AOT (1 mM)) de duas fases aquosas em Tampão McIlvaine pH 6,5 após 3 horas de reação. As barras de erro correspondem a um intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos. 82
- FIGURA 36** Efeito no ponto de névoa da adição de diferentes concentração de AOT a 3% m/m de Triton X-114 em Tampão McIlvaine pH 6,5. As barras de erro correspondem a um intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos. 83
- FIGURA 37** Coeficientes de partição do ácido clavulânico proveniente do meio fermentado (K_{AC}) obtidos em sistemas micelares mistos (Triton X-114 (3%)/AOT) de duas fases aquosas em Tampão McIlvaine pH 6,5. As barras de erro correspondem a um intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos. 84
- FIGURA 38.** Balanço de Massa (BM_{AC}) e recuperação do ácido clavulânico na fase diluída (η_{AC}) apresentadas pelas barras cinzas e brancas, respectivamente, obtidas em sistemas mistos (Triton X-114 (3%)/AOT) de duas fases aquosas em Tampão McIlvaine pH 6,5 após 3 horas de reação. As barras de erro correspondem a um intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos. 84

- FIGURA A.1** Curva de calibração de absorvância em função da concentração de ácido clavulânico em espectrofotômetro Shimadzu UV-1650PC obtida experimentalmente. **103**
- FIGURA A.2** Curva de calibração de absorvância em função da concentração de ácido clavulânico em espectrofotômetro Beckman DU-640 obtida experimentalmente. **103**
- FIGURA A.3** Curva de calibração de absorvância em função da concentração de glicerol obtida experimentalmente. **104**

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	As cinco principais classes de antibióticos β -lactâmicos.	5
TABELA 2	Meios de cultura F ₁ , F ₂ e F ₃ utilizados para produção de ácido clavulânico.	28
TABELA 3	Condições dos sistemas contendo tensoativos utilizados para estudo da estabilidade do ácido clavulânico.	31
TABELA 4	Condições dos ensaios realizados para analisar a interferência do meio fermentado no ponto de névoa do sistema micelar misto de duas fases aquosas.	33
TABELA 5	Níveis utilizados das variáveis avaliadas no planejamento 2 ⁴ com 04 repetições no ponto central.	36
TABELA 6	Matriz do planejamento 2 ⁴ com 04 repetições no ponto central para avaliar a influência dos fatores: concentração de AOT, de Triton X-114, de NaCl e temperatura na extração por sistema micelar de duas fases aquosas de ácido clavulânico proveniente de meio fermentado.	37
TABELA 7	Condições dos experimentos seriados na extração de ácido clavulânico proveniente do meio fermentado pelo sistema micelar misto de duas fases aquosas Triton X-114/AOT/Tampão.	38
TABELA 8	Produtividade do ácido clavulânico (P _{AC}) ao longo das 168 horas de bioprocessamento para os meios F ₁ , F ₂ e F ₃ .	51
TABELA 9	Ponto de névoa dos sistemas formados pelos tensoativos Triton X-114 e AOT, Tampão McIlvaine com e sem a presença do meio fermentado. Os erros correspondem a um intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos.	70
TABELA 10	Níveis reais empregados no planejamento fatorial completo 2 ⁴ com 4 repetições no ponto central para avaliação da influência da concentração de AOT, Triton X-114 e NaCl e da temperatura sobre o processo de extração do ácido clavulânico por sistema micelar misto de duas fases e os valores das respostas, coeficiente de partição (K _{AC}) e recuperação de ácido clavulânico na fase diluída (η_{AC}), obtidos experimentalmente.	75
TABELA 11	Estimativa dos efeitos, erros-padrão e teste <i>t</i> (Sudent) para K _{AC} na recuperação de ácido clavulânico por sistema micelar misto de duas fases aquosas.	77

TABELA 12	Parâmetros da análise de variância (ANOVA) de K_{AC} para os fatores significativos da extração de ácido clavulânico por sistema micelar misto (Triton X-114/AOT) de duas fases aquosas.	78
TABELA 13	Estimativa dos efeitos, erros-padrão e teste t (Sudent) para η_{AC} na recuperação de ácido clavulânico do meio fermentado por sistema micelar misto de duas fases aquosas.	79
TABELA 14	Parâmetros da análise de variância (ANOVA) de η_{AC} para os fatores significativos da extração de ácido clavulânico por sistema micelar misto (Triton X-114/AOT) de duas fases aquosas.	80

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ac	Ácido clavulânico
Ac_{ini}	Concentração inicial de ácido clavulânico (mg.L ⁻¹)
Ac_{sol}	Concentração de ácido clavulânico na solução (mg.L ⁻¹)
ANOVA	Análise de variância
AOT	Tensoativo aniônico Bis(2-etilhexil) sulfocinato de sódio
BM_{AC}	Balanço de massa
C₈-lecitina	Tensoativo zwitteriônico Dioctanoilfosfatidilcolina
C_{ion}	Concentração molar de íons (M)
C_P	Concentração de ácido clavulânico (mg.L ⁻¹)
C_c	Concentração da biomolécula na fase concentrada – c (rica em micelas) (mg.L ⁻¹)
C_d	Concentração da biomolécula na fase diluída – d (pobre em micelas) (mg.L ⁻¹)
C_i	Concentração inicial da biomolécula (mg.L ⁻¹)
CMC	Concentração micelar crítica
CTAB	Tensoativo catiônico Brometo de cetiltrimetil amônio
C₁₀E₄	Tensoativo não-iônico Óxido de n-deciltetraetileno
dX/dt	Velocidade de crescimento celular (g/L.h)
dS/dt	Velocidade de consumo de substrato (g/L.h)
dAC/dt	Velocidade de formação de ácido clavulânico (mg/L.h)
F₁	Meio descrito por Porto <i>et al.</i> , (1996) sem a adição de NH ₄ Cl e extrato de levedura
F₂	Meio descrito por Ortiz <i>et al.</i> , (2007) substituindo a farinha de soja por extrato de farinha de soja
F₃	Meio F ₂ com o óleo de soja substituído por milhocina
K_{AC}	Coeficiente de partição
N_{ag}	Número de agregação
SMDFA	Sistema micelar de duas fases aquosas
P_{AC}	Produtividade em ácido clavulânico (mg.L ⁻¹ . h ⁻¹)
PBP_s	Proteínas receptoras de penicilina
PEG	Polietileno glicol
POE	Polióxido de etileno

S	Concentração de substrato (g.L^{-1})
SDS	Tensoativo aniônico Dodecil sulfato de sódio
Tampão MOPS	Ácido-3-[N-Morfolino]-propanosulfônico
Triton X-100	Tensoativo não-iônico T-octilfenoxipoliétoxietanol
Triton X-114	Tensoativo não-iônico Polioxietileno p-t-octil fenol
V_c	Volume da fase rica em micelas (c) (mL)
V_d	Volume da fase pobre em micelas (d) (mL)
V_i	Volume total da solução inicial (mL)
V_{COD}	Valor codificado da variável independente
V_R	Valor real da variável independente
V_O	Valor real da variável independente no ponto central
ΔV_R	Valor do passo
Z_i	Carga iônica
X	Concentração celular (g.L^{-1});

Letras Gregas

β^M	Interação molecular
μ_X	Velocidades específicas de crescimento (h^{-1})
μ_S	Velocidades específicas de consumo de substrato (h^{-1})
μ_{AC}	Velocidades específicas de formação de ácido clavulânico produto (h^{-1})
η_{AC}	Recuperação da biomolécula na fase diluída
μ	Força iônica (M)

RESUMO

SANTOS, V.C. **Extração líquido-líquido de ácido clavulânico empregando sistemas micelares mistos de duas fases aquosas.** 2009. 103f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

O ácido clavulânico é um potente inibidor de β -lactamases utilizado como terapêutico em associação à amoxicilina. O processo industrial de obtenção envolve o cultivo bacteriano em processo descontínuo, enquanto que a sua purificação é realizada, principalmente, por processos de extração líquido-líquido com solventes orgânicos e etapas cromatográficas. Assim, métodos alternativos como a purificação empregando sistemas micelares de duas fases aquosas (SMDFA), os quais oferecem um ambiente hidrofóbico e hidrofílico que possibilita seletividade na partição de biomoléculas de acordo com sua hidrofobicidade, são de grande interesse. Neste trabalho estudou-se a viabilidade da utilização de sistema micelar misto (não-iônico/aniônico) de duas fases aquosas formados pelos tensoativos não-iônico Triton X-114 e aniônico AOT na extração do ácido clavulânico proveniente de cultivo submerso de *Streptomyces clavuligerus* em processo descontínuo. A estabilidade do ácido clavulânico em relação ao pH, sais e suas concentrações, temperatura e aos tensoativos foi investigada visando limitar as regiões a serem estudadas nas extrações. Determinou-se ainda o ponto névoa dos sistemas Triton X-114/Tampão e Triton X-114/AOT/Tampão em diferentes condições, bem como, estudos de migração da biomolécula para as fases e do tempo necessário para o equilíbrio do sistema. A partir destas investigações iniciais, foram definidos os níveis das variáveis: concentração de AOT (0,50, 0,75 e 1,00 mM), Triton X-114 (1, 3 e 5% m/m), NaCl (0, 0,05 e 0,10 M) e temperatura (24, 26 e 28°C), cujas influências sobre o coeficiente de partição (K_{AC}) e recuperação da biomolécula na fase diluída (η_{AC}) foram investigadas através de um planejamento fatorial. A análise estatística e o modelo matemático obtido a partir dos resultados para K_{AC} revelou ser possível obterem-se $K_{AC} \approx 1,65$ e $\eta_{AC} \approx 71,58\%$. No entanto, a análise estatística empregando η_{AC} como resposta apontou condições experimentais desprovidas de significado físico-químico. Em experimentos seriados realizados com Triton X-114 3% m/m, Tampão McIlvaine pH 6,5 e adição gradual de AOT, um aumento da concentração deste tensoativo levou a maiores K_{AC} e Balanço de massa (BM_{AC}) $\approx 85\%$. Desta forma é possível concluir que o sistema micelar misto de duas fases aquosas proporciona baixa perda da biomolécula e partição para a fase diluída, que é uma vantagem devido a menores problemas em uma etapa subsequente de purificação.

PALAVRAS-CHAVE: Sistema micelar misto de duas fases aquosas. Triton X-114/AOT. *Streptomyces clavuligerus*. Ácido clavulânico.

ABSTRACT

SANTOS, V.C. **Liquid-liquid extraction of clavulanic acid employing two-phase aqueous mixed micellar systems.** 2009. 103f. Thesis – College of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo. 2009.

Clavulanic acid is a potent inhibitor of β -lactamases that is used as a therapeutic in conjunction with amoxicillin. Its industrial process of production involves bacterial growing in a batch process, while its purification is carried out mainly by process of liquid-liquid extraction with organic solvents and chromatographic steps. Thus, alternative methods like the purification employing two-phase aqueous micellar systems, which offer both hydrophobic and hydrophilic environments to solute species and allow selectivity in partitioning depending on the hydrophobicity of biomolecules, are of great concern. This work studied the feasibility of using two-phase aqueous mixed (nonionic/anionic) micellar systems formed by nonionic surfactant Triton X-114 and anionic surfactant AOT to extract clavulanic acid from broths fermented by *Streptomyces clavuligerus* in batch process. The stability of clavulanic acid at different values of pH, salts and their concentration, temperature and in the presence of different surfactants was investigated so as to limit the areas to be submitted to further studies. The cloud-point of the systems Triton X-114/Buffer and Triton X-114/AOT/Buffer was also determined under different conditions, and studies were performed on partitioning the biomolecule between the phases and the time needed to balance of the system. From these initial investigations the following levels of the variables were defined: concentration of AOT (0.50, 0.75, and 1.00 mM), Triton X-114 (1, 3 and 5% w/w), NaCl (0, 0.05 and 0.10 M) and temperature (24, 26 and 28°C), whose influences on the partition coefficient (K_{CA}) and yield in the top phase (η_{CA}) were investigated using factorial design. Statistical analysis and the mathematical model derived from the results allowed obtaining $K_{CA} \approx 1.65$ e $\eta_{CA} \approx 71.58\%$. However, the statistical analysis using the response η_{CA} indicated experimental conditions devoid of any physico-chemical meaning. In serial experiments performed with Triton X-114 3% w/w, McIlvaine buffer at 6.5 pH and gradual addition of AOT, an increase in the concentration of anionic surfactant led to higher K_{CA} and mass balance ($BM_{CA} \approx 85\%$). Thus, is possible conclude that the two-phase aqueous mixed micellar system provides low loss and partition to dilute phase, which is an advantage because it implies less problems in a subsequent step of purification.

KEY-WORDS: Two-phase aqueous mixed micellar systems. Triton X-114/AOT. *Streptomyces clavuligerus*. Clavulanic acid.

1. INTRODUÇÃO

A utilização de microrganismos em processos biotecnológicos tem ocorrido em diferentes segmentos industriais, tais como em indústrias alimentícias e farmacêuticas. Um dos produtos obtidos por microrganismo pela indústria farmacêutica são os antibióticos, como o ácido clavulânico, produto do metabolismo secundário de *Streptomyces clavuligerus*.

O ácido clavulânico é um antibiótico de atividade fraca, no entanto, constitui-se de um poderoso inibidor de β -lactamases, enzimas produzidas por bactérias resistentes a penicilinas e cefalosporinas. Seu emprego em combinação com estes antibióticos produz um intermediário acilado capaz de inativar essas enzimas (Foulstone e Reading, 1982; Baggaley *et al.*, 1997). O estudo da purificação deste antibiótico, se justifica, pois embora existam inúmeros fármacos com função antibiótica em uso clínico (e outros em desenvolvimento) há grande demanda por estes compostos, devido ao aumento no número de bactérias patogênicas resistentes a antibióticos β -lactâmicos comercializados.

O processo industrial de purificação do ácido clavulânico inclui diversas etapas que se iniciam ao final da produção por fermentação. Primeiramente o meio é clarificado, por filtração ou centrifugação, para retirada do micélio de *S. clavuligerus*. A etapa seguinte de extração inclui processos de adsorção, cromatografia de troca iônica ou extração líquido-líquido com solvente orgânico. Os dois primeiros métodos são ainda hoje, por apresentarem altos rendimentos, os mais utilizados para componentes de baixo peso molecular presentes em soluções diluídas, como é o caso dos antibióticos produzidos por bioprocessos. Porém, no caso do ácido clavulânico, o rendimento relatado por essas técnicas é geralmente baixo, devido à rápida degradação da biomolécula sob condições normais do processo. Assim, novos métodos de purificação com melhores rendimentos e menores custos despertam grande interesse, visto à expansão no uso do ácido clavulânico pela indústria farmacêutica (Butterworth, 1984; Mayer e Deckwer, 1996).

Dentre os diferentes sistemas de extração líquido-líquido, o sistema micelar misto de duas fases aquosas apresenta propriedades diferentes, e algumas vezes superiores, aos sistemas simples. Constitui-se de uma única fase micelar, homogênea, que com o aumento da temperatura pode se separar em duas fases aquosas, uma rica em micelas e a outra pobre,

permitindo a seletividade na partição de acordo com as características das moléculas presentes.

O presente trabalho tem como objetivo estudar a viabilidade da utilização de sistemas micelares mistos de duas fases aquosas em substituição as etapas convencionalmente empregadas para purificação do ácido clavulânico proveniente do meio fermentado.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Antibióticos

Antibióticos constituem um dos principais produtos do metabolismo secundário de fungos e bactérias. São moléculas que inibem o crescimento e/ou sobrevivência de microrganismos sem causar sérios efeitos tóxicos para o hospedeiro (Williams e Lemke, 2002). O primeiro antibiótico descoberto foi a penicilina em 1928 por Alexander Fleming, que estudava a bactéria patogênica *Staphylococcus aureus*, ao observar uma lise bacteriana em placa devido a uma contaminação fúngica. Fleming isolou o fungo, demonstrando que um composto químico produzido pelo mesmo causou a lise. O fungo foi identificado como *Penicillium notatum* (posteriormente, renomeado *P. chrysogenum*) e o composto denominado penicilina. Na década de 40, Selman Waksman descobriu uma série de novos antibióticos, como a actinomicina, a estreptomicina e a neomicina, produzidas por bactérias provenientes do solo. A descoberta da estreptomicina, o primeiro antibiótico eficaz contra a tuberculose, proporcionou a Waksman o Prêmio Nobel de Medicina em 1952 (Pelczar *et al.*, 1996, Rokem *et al.*, 2007).

Durante os anos de 1950 e 1960, muitos medicamentos antibacterianos (tetraciclina, eritromicina, kanamicina), antifúngicos (candidina e nistatina), e antineoplásicos (adriamicina) foram descobertos por pesquisas acadêmicas e industriais (Challis e Hopwood, 2003). Todavia, a taxa de descoberta caiu drasticamente após os anos 70, sendo que atualmente, diversos esforços científicos possibilitaram uma melhoria dos rendimentos dos bioprocessos (Demain, 2007).

Existem muitas classes de antibióticos em uso clínico, que podem ser produtos naturais, derivados semissintéticos ou sintéticos. Os sintéticos são divididos em três classes de antibióticos: sulfa, quinolonas e os oxazolidinonas (Walsh, 2003).

A variedade e complexidade de antibióticos produzidos são enormes. Mais da metade das drogas aprovadas entre 1981 e 2002 são baseadas em compostos naturais. Assim, produtos naturais continuam desempenhando um papel importante na descoberta e elaboração de novas drogas. Quatro de nove antibacterianos e antifúngicos aprovados no período de 2003 a Junho de 2006 pelo FDA foram de produtos naturais ou derivados a partir destes. A vasta gama de diferentes estruturas químicas encontradas nos antibióticos pode ser dividida nos seguintes grupos químicos: policetídeos (polienos), peptídeos, glicopeptídeos, terpenos, nucleosídeos, alcalóides, aminoglicosídeos, quininas e cumarínicos (Rokem *et al.*, 2007).

Os antibióticos podem também ser agrupados em classes de acordo com o seu alvo na superfície da célula bacteriana ou no interior da célula, sendo elas: (i) a biossíntese da parede celular bacteriana é inibida pelos antibióticos β -lactâmicos e pela classe dos glicopeptídios como a vancomicina; (ii) ribossomos bacterianos são seletivamente bloqueados na subunidade 30S por aminoglicosídeos e tetraciclina e as subunidades 50S pela família dos antibióticos macrolida; (iii) a família das drogas antibacterianas quinolonas, exemplificado pela ciprofloxacina, age bloqueando a replicação do DNA bacteriano por desorientar intermediários catalíticos nas reações catalisadas por DNA topoisomerasas; (iv) a via biosintética da coenzima folato, essencial para proporcionar unidades monoméricas para a síntese de DNA, é bloqueada por drogas sulfa e trimetoprim, enquanto que peptídeos perturbam a integridade da membrana (Walsh, 2003).

Dentre os antibióticos comercializados, uma das maiores e mais importantes classes de antibióticos clínicos são os pertencentes da família dos β -lactâmicos, particularmente penicilinas e cefalosporinas. Em 2003, suas vendas representaram, aproximadamente, \$15 bilhões, e como uma família, constituíram mais do que 65% do mercado global de antibióticos (Elander, 2003). Já em 2004, o mercado global de antibióticos era de \$55 bilhões, representado por 62% de antibacterianos, 13% soros, imunoglobulinas e vacinas, 12% antivirais para AIDS, 7% antifúngicos e 6% de outros antivirais (Demain, 2007). No Brasil, o Ministério da Saúde, em 2002, investiu R\$ 3 bilhões na aquisição de

medicamentos e desse total, R\$ 997,17 milhões foram gastos em remédios de programas estratégicos (AIDS, tuberculose, hanseníase, malária, esquistossomose, tracoma, leishmaniose, meningite, cólera, filariose, diabetes e hemofilia), R\$ 332,79 milhões com remédios essenciais (antibióticos, analgésicos, antitérmicos, antidepressivos e outros) e R\$ 489,53 milhões com medicamentos excepcionais (para tratamento de doenças crônicas e de alto custo). O restante R\$ 1,18 bilhão destinou-se à compra de fármacos de uso hospitalar. Entre 2002 e 2006, o gasto total em medicamentos do Ministério da Saúde aumentou em 115% (<http://portal.saude.gov.br/saude/dezembro/2008>).

Os antibióticos β -lactâmicos são assim denominados por possuírem o anel β -lactâmico como parte de um sistema de anéis heterocíclicos (Pelczar *et al.*, 1996). Ao anel β -lactâmico diferentes estruturas podem estar anexadas, dividindo estes antibióticos em cinco classes principais (TABELA 1) (Coulthurst *et al.*, 2005). Seus efeitos se dão através da interferência na maquinaria metabólica, responsável pelo crescimento e desenvolvimento da parede celular bacteriana (Charnas e Knowles, 1981). O alvo desses compostos β -lactâmicos é a reação de transpeptização (Madigan *et al.*, 1997). Esse mecanismo baseia-se na união de β -lactâmicos a receptores específicos localizados na superfície interna da membrana celular bacteriana, denominados “proteínas receptoras de penicilina” (PBPs). As PBPs possuem um papel chave nas fases finais da síntese de peptidoglicano, pois elas catalisam a ligação cruzada das subunidades da parede celular. Para a sua atuação, os β -lactâmicos devem primeiramente penetrar na parede celular bacteriana. A camada glicopeptídica das bactérias Gram-positivas é espessa e externa a uma membrana celular única, enquanto a camada glicopeptídica das bactérias Gram-negativas, que é muito mais delgada, encontra-se entre a membrana plasmática e a membrana celular externa. Sendo assim, os β -lactâmicos podem atuar mais facilmente nas bactérias Gram-positivas (Koneman *et al.*, 2001).

TABELA 1. As cinco principais classes de antibióticos β -lactâmicos.

Estrutura	Classe	Exemplo	Microrganismos produtores
Penicilina	Penicilina G	<i>Penicillium chrysogenum</i>
Cefalosporina/ Cefamicina	Cefalosporina C	<i>Acremonium chrysogenum</i>
Monobactâmicos	Nocardicina A	<i>Nocardia uniformis</i>
Clavam	Ácido clavulânico	<i>Streptomyces clavuligerus</i>
Carbapenem	Tienamicina	<i>Streptomyces cattleya</i>

Infelizmente, tanto bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus licheniformes*, *Mycobacterium sp.*) como Gram-negativas (*Escherichia coli*, *Proteus sp.*, *Klebsiella aerogenes*, *Enterobacter cloacae*, *Pseudomonas aeruginosa*) desenvolveram resistência a estes antibióticos (Reading e Cole, 1977; Baggaley *et al.*, 1997). A resistência aos medicamentos poderia ser uma consequência inevitável da aplicação clínica de antibióticos e, por isso, há uma constante necessidade por novos fármacos antimicrobianos (Coulthurst *et al.*, 2005). Três mecanismos podem ser responsáveis por esta resistência: alteração nas PBPs; difícil acesso dos β -lactâmicos à célula (eliminação de porinas ou outras proteínas de membrana) e ativação de enzimas β -lactamases, que clivam o anel β -lactâmico de penicilinas e cefalosporinas, inativando-as (Reading e Cole, 1977).

Existem vários tipos de β -lactamases, que são classificadas pela sua sequência de aminoácidos e substratos produzidos (Stapleton *et al.*, 1999). A atividade destas enzimas

constitui o principal mecanismo de resistência das bactérias aos antibióticos β -lactâmicos. A síntese dessas enzimas é induzida tanto pela presença de antibiótico β -lactâmico quanto pela de precursores da parede celular do meio extracelular (Nagano *et al.*, 1999). A primeira β -lactamase foi identificada em *Escherichia coli*, durante estudos para a utilização de penicilina na prática médica. O grau de resistência da bactéria depende da quantidade de enzima produzida, da habilidade dessa enzima em hidrolisar o antimicrobiano em questão (potência) e da velocidade com que o β -lactâmico penetra pela membrana externa da bactéria (permeabilidade da membrana) (Bradford, 2001). A FIGURA 1 representa a abertura do anel β -lactâmico de alguns antibióticos por ação das enzimas β -lactamases.

FIGURA 1. Abertura hidrolítica do anel e desativação de (A) penicilinas, (B) cefalosporinas e (C) carbapenem por β -lactamases (Walsh, 2003).

A respeito dos problemas clínicos, com o aumento da resistência bacteriana, os antibióticos β -lactâmicos continuam sendo importantes e efetivos na terapia antimicrobiana em muitas situações, levando a indústria farmacêutica a desenvolver estratégias para conter a expansão das β -lactamases e garantir a continuidade da terapia antimicrobiana dos β -lactâmicos com melhores resultados. Uma das estratégias consiste em alterar a estrutura do

β -lactâmico, tornando-o insensível à hidrólise pelas β -lactamases, embora mantendo seu potencial como antibiótico. Porém, foi verificado que moléculas mais resistentes às β -lactamases também são, em geral, menos eficazes como antibióticos. Uma segunda estratégia seria incluir compostos que potencializem a ação dos antibióticos β -lactâmicos por sensibilizarem a resistência bacteriana dentre os quais tem especial destaque o ácido clavulânico (Oliveira, 2004).

2.2. Ácido Clavulânico

O ácido clavulânico (FIGURA 2) é um β -lactâmico bicíclico (anel β -lactâmico e oxazolidino condensados), que diferentemente das penicilinas e cefalosporinas, possui um átomo de oxigênio no lugar do enxofre (Butterworth, 1984).

FIGURA 2. Estrutura química do ácido clavulânico (Reading e Cole, 1977).

É um metabólito produzido por várias espécies de *Streptomyces*, porém, sua principal produtora é a *S. clavuligerus*. Este antibiótico foi isolado em 1971 através de um programa de estudo de produtos naturais designado para descobrir potenciais inibidores de β -lactamases (Nagarajan *et al.*, 1971, Finlay *et al.*, 2003). A seleção de *S. clavuligerus* para o estudo foi devido a sua habilidade de produzir Cefamicina C, e o ácido clavulânico foi somente descoberto quando cepas dos primeiros experimentos foram subsequentemente examinadas para a produção de inibidores de β -lactamases. Em adição, um número de outras espécies que produzem antibióticos inibidores de β -lactamases que são estruturalmente relacionados com o ácido clavulânico tem sido descritos. Porém, o ácido clavulânico com a sua estereoquímica 3S, 5R é o único entre estes metabólitos que apresentam atividade inibitória de β -lactamase. Todos os outros com esta estereoquímica

não são inibidores destas enzimas, embora alguns apresentem propriedades antibacterianas e antifúngicas (Saudagar *et al.*, 2008).

O ácido clavulânico é um antibiótico de atividade fraca (concentração inibitória mínima de 25-125 µg/mL), mas constitui um poderoso inibidor de β -lactamases (Reading e Cole, 1977), pois este fármaco liga-se irreversivelmente à serina do grupo hidroxila do centro ativo das β -lactamases, produzindo um intermediário acilado estável e assim inativando a enzima (Foulstone e Reading, 1982; Baggaley *et al.*, 1997) (FIGURA 3). O clavulanato de potássio pode ser encontrado em associação com a penicilina semissintética amoxicilina (AugmentinTM) ou com ticarcilina (TimentinTM) (Watve *et al.*, 2000). No Brasil, o medicamento CLAVULIN, comercializado pela SMITHKLINE BEECHAM Farmacêutica, é um exemplo deste tipo de associação.

FIGURA 3. Reencaminhamento da acilo-enzima intermediária pelo ácido clavulânico para inativar β -lactamases (Walsh, 2003).

O ácido clavulânico é produzido por bioprocesso por várias espécies de *Streptomyces*, entre elas, a *S. clavuligerus*, bactéria filamentosa Gram-positiva, aeróbia estrita, pertencente ao grupo dos actinomicetos e predominantemente encontrada no solo (Lechevalier, 1981). Esses microrganismos apresentam um ciclo de vida complexo, que se inicia com a germinação de esporos, originando um micélio vegetativo formado por hifas

ramificadas (primárias) que penetram no substrato, metabolizando fontes orgânicas tais como polissacarídeos, proteínas, lipídios e compostos aromáticos pela ação de enzimas extracelulares (Pamboukian, 2003). Do micélio vegetativo é originado o micélio aéreo, o qual passa por um processo de diferenciação morfológica que pode incluir septação e formação de esporos. Nessa fase, ativa-se o metabolismo secundário e são produzidos principalmente os antibióticos (Demain, 1989). Sabe-se que esta bactéria é capaz de produzir cerca de 21 metabólitos secundários, incluindo vários compostos β -lactâmicos como a penicilina N, a cefamicina C e a desacetoxicefalosporina C (Ortiz, 2005).

Diversos pesquisadores vêm realizando estudos de otimização de culturas submersas para produção de ácido clavulânico a partir de *Streptomyces clavuligerus* (Mayer e Deckwer, 1996; Ives e Bushell, 1997; Gouveia *et al.*, 1999; Lynch e Yang, 2004; Maranesi *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2005; Saudagar e Singhal, 2006; Ortiz *et al.*, 2007), assim como, estudos para elucidar a rota biossintética deste fármaco (Élson e Oliver, 1978; Butterworth, 1984; Gutman *et al.*, 1985; Townsend e Ho, 1985; Romero *et al.*, 1986; Valentine *et al.*, 1993; Ives e Bushell, 1997; Jensen *et al.*, 2000).

Por ser um metabólito secundário, o ácido clavulânico é produzido por um processo fermentativo comercial clássico, que pode ser dividido em três fases (Omstead *et al.*, 1985):

- A primeira fase é o desenvolvimento do inóculo, onde ocorre sequencialmente uma série de reações mistas;
- A segunda fase usualmente é uma reação única e consiste do estágio em que os antibióticos são microbiologicamente sintetizados;
- A terceira fase consiste da recuperação do produto (Saudagar *et al.*, 2008).

A biossíntese de metabólitos secundários está relacionada ao metabolismo primário da célula produtora. Assim, os precursores dos metabólitos secundários são, usualmente metabólitos primários normais ou modificados (Martín e Liras, 1986).

Os metabolitos primários precursores do ácido clavulânico são o D-gliceraldeído-3-fosfato (G3P) (Khaleeli *et al.*, 1999), que é convertido a 1,3-Bifosfoglicerato pela gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GADPH) pela via glicolítica e entra no Ciclo de Krebs através do piruvato (Li e Townsend, 2006), e a L-arginina (Valentine *et al.*, 1993), sendo precursores do C₃ e C₅ do ácido clavulânico, respectivamente (Ives e Bushell, 1997). Além disso, experimentos de alimentação com radiomarcadores indicaram que a arginina e

microrganismo não consegue metabolizar a glicose e desviar o mecanismo para a biosíntese de ácido clavulânico (Ortiz *et al.*, 2007).

Élson e Oliver (1978) usaram marcador para o glicerol durante sua alimentação ao meio de fermentação e demonstraram claramente que este componente foi incorporado ao anel β -lactâmico do ácido clavulânico. Chen *et al.* (2002) reportaram que o glicerol na faixa de 10-20 g/L aumenta a produção do ácido clavulânico em agitador rotativo.

As fontes de nitrogênio usualmente favoráveis ao crescimento, como os sais de amônio, apresentam efeito negativo sobre o metabolismo secundário (Fang e Demain, 1995). A presença de amônia ou íon amônio em quantidade suficientemente elevada, isto é, não limitante, reprime as enzimas envolvidas na assimilação de outras fontes de nitrogênio, tais como aminoácidos e uréia (White, 1995).

Butterworth (1984) relata que a farinha de soja é o nutriente mais importante na biossíntese de ácido clavulânico por *Streptomyces clavuligerus*. Estudos realizados por Romero *et al.* (1984), indicaram que concentrações acima de 10 mM de sais de amônio e ácido glutâmico reduziram a biossíntese de ácido clavulânico por *S. clavuligerus*. O uso de aminoácidos em meios de cultura foi sugerido para suprir as necessidades de nitrogênio do microrganismo.

Estudos da adição de ácido glutâmico, arginina e ornitina em meios de cultura realizados em 1986 por Romero *et al.* relataram baixa produção de ácido clavulânico na presença de ácido glutâmico, em contraste com uma melhor produção observada na presença de ornitina e arginina.

Saudagar e Singhal (2006) obtiveram um aumento de, aproximadamente, 18% na produção de ácido clavulânico por batelada alimentada ao alimentarem o meio de cultivo com glicerol e um aumento global de 18 e 9% ao alimentarem o meio com arginina e treonina, respectivamente.

Jones *et al.* (1997) descreveram a não ocorrência de produtos oriundos de metabolismo secundário em cultivos de *S. clavuligerus* quando este é realizado sob condições de limitação de nitrogênio.

Valentine *et al.* (1999) descreveram em seus estudos o acúmulo de uréia oriunda da biossíntese do ácido clavulânico, e também de outras fontes e que a presença de amônia em quantidades elevadas reprime as enzimas envolvidas na produção do ácido clavulânico.

Wang *et al.* (2005) estudaram a otimização da composição do meio para a produção do ácido clavulânico adicionando ornitina ao meio de cultivo através de planejamento fatorial e obtiveram como resultado que as variáveis significativas ao processo foram a farinha de soja, o $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e a ornitina, sendo que estes componentes nas concentrações ótimas de 38,102 g/L, 0,395 g/L e 1,177 g/L, respectivamente, apresentaram uma produção de 681 mg/L de ácido clavulânico, um aumento em torno de 50% em relação a condição não otimizada.

A adição de óleos vegetais (soja e milho) ao meio de cultivo como fonte secundária de carbono foi estudada por Maranesi *et al.* (2005) em incubador rotativo. Os melhores resultados foram obtidos ao se utilizar o óleo de soja, sendo que a máxima produção de ácido clavulânico (722 mg/L) foi obtida na condição com 23 g/L do óleo de soja.

Ortiz *et al.* (2007) estudaram a influência de derivados de soja na produção do ácido clavulânico por *S. clavuligerus* em incubador rotativo. Em relação à fonte de nitrogênio utilizando farinha de soja e proteína de soja isolada, a produção no meio de cultivo com farinha de soja foi, aproximadamente, o dobro da obtida com a segunda fonte. Os autores investigaram ainda a influência da presença de óleo de soja no meio cultivo e ao trabalharem com uma concentração de 23 g/L obtiveram 700 mg/L de ácido clavulânico, valor muito próximo ao obtido por Maranesi *et al.* (2005).

2.2.1. Estabilidade do Ácido Clavulânico

Como outros compostos β -lactâmicos, o ácido clavulânico apresenta uma forma que é quimicamente instável, pois sua molécula apresenta um átomo susceptível ao ataque por íons hidróxido (OH^-) e pela molécula de água: o grupo carbonila do anel β -lactâmico (Konecny *et al.*, 1975). Alguns grupos de pesquisa têm realizado estudos da estabilidade deste fármaco em solução aquosa sob diferentes condições (Haginaka *et al.*, 1981; Mayer e Decker, 1996; Bersanetti *et al.*, 2005).

Haginaka *et al.* (1981), investigando a estabilidade do ácido clavulânico a 35°C e uma força iônica de 0,5 M em uma faixa de pH entre 3,1 e 10,1, observaram uma taxa de degradação constante e dependente do pH. A maior estabilidade do ácido clavulânico obtida foi em pH 6,39. O efeito catalítico da espécie do tampão em pH a força iônica constante também foi estudado e os autores encontraram uma maior degradação do fármaco

com o aumento da concentração do tampão. Além disto, tanto a catálise ácida quanto a básica proporcionada pelos sais do tampão desempenhou um papel significativo na hidrólise. Estes autores chegaram à conclusão que a taxa de degradação do fármaco segue uma cinética de degradação de pseudo-primeira ordem.

Bersanetti *et al.* (2005) estudando a estabilidade do ácido clavulânico de diversas fontes na faixa de temperatura de 10 a 45°C a pH 6,2 e 7,0 observaram que o ácido clavulânico proveniente do meio fermentado foi menos estável do que o comercial e que a taxa de degradação seguiu uma cinética de primeira ordem. Os autores observaram ainda uma degradação mais rápida em soluções básicas do que em soluções ácidas.

Mayer e Deckwer (1996) estudaram a produção e a degradação simultânea de ácido clavulânico durante o cultivo com *S. clavuligerus* em meios complexos de soja. A estabilidade do ácido clavulânico *in vivo* e *in vitro* foi investigada. Os autores concluíram que a taxa constante de inativação para o ácido clavulânico *in vivo* foi de duas a dez vezes superiores a obtida *in vitro*. Enquanto a hidrólise ácida pareceu ser responsável pela instabilidade obtida do ácido clavulânico *in vitro*, como indicado pela dependência ao pH da taxa constante de degradação, outros mecanismos adicionais foram ativados na degradação do ácido clavulânico durante a fase estacionária das culturas em meio de extrato de soja.

2.2.2. Processos de Purificação do Ácido Clavulânico

O ácido clavulânico e seus sais têm sido extraídos diretamente do meio de cultura de diversas maneiras, mas geralmente as células de *S. clavuligerus* são inicialmente removidas do meio de cultivo por filtração ou centrifugação e descartadas, antes que outros processos de extração sejam iniciados (Saudagar *et al.*, 2008).

Butterworth (1984) sugeriu dois processos adequados de purificação do ácido clavulânico para uso em larga escala após a clarificação do meio fermentado. O primeiro seria uma extração acidificando o caldo de fermentação e utilizando um solvente orgânico imiscível na fase aquosa, e o segundo uma adsorção com resina de troca iônica de base forte seguida por uma eluição com uma solução salina. A purificação seria realizada posteriormente por métodos cromatográficos, principalmente, cromatografia de troca

iônica. No fim do processo, uma liofilização ou cristalização da solução aquosa proporcionaria um produto de alto grau de pureza.

Cole *et al.* (1978) (patente US4110165) descreveram que no processo de extração por solvente, a solução deve ser resfriada, o pH reduzido a uma faixa de 2-3 e misturada com um solvente orgânico como *n*-butanol. Após a separação de fases por centrifugação, o ácido clavulânico é extraído da fase orgânica pela adição de uma solução tampão com pH em torno de 7,0. O extrato aquoso pode ser concentrado utilizando pressão reduzida a um sal de ácido clavulânico, que é estável ao ser armazenado como um sólido seco a -20°C.

Nabais e Cardoso (1995) estudaram a ultrafiltração de caldos fermentados e a utilização de extração com solventes orgânicos para antibióticos. Os autores compararam a extração do ácido clavulânico com *n*-butanol a pH 2,0 proveniente de dois processos diferentes: meio fermentado filtrado com auxiliar de filtração e meio fermentado ultrafiltrado. Os resultados encontrados para a extração global do antibiótico foram similares. Todavia, a ultrafiltração trouxe benefícios ao processo, como separação de fases mais rápida, redução das perdas de solvente e geração de efluentes de extração mais límpidos, com a desvantagem de aumentar a diluição do produto devido à diafiltração, sendo necessária uma concentração deste antes da etapa de extração por solvente.

Outros autores reportaram processos de extração de ácido clavulânico utilizando solventes orgânicos e, posteriormente, formando éster e sais de ácido clavulânico (Simon, 2001 (patente US6172221); Cook *et al.*, 1981; Cook e Wilkins 1995; Zhang e Mcknight, 2003). Outro conhecido processo de purificação secundária para o ácido clavulânico envolve o uso de outra amina orgânica para formar sais e/ou outros derivados com o ácido clavulânico. Este processo de purificação tem uma desvantagem inerente, pois ele pode introduzir traços de amina, ou levar traços residuais de sais de ácido clavulânico com amina, no produto final (Saudagar *et al.*, 2008).

Videira e Aires-Barros (1994) estudaram a extração do ácido clavulânico a partir do meio fermentado utilizando sistemas de duas fases aquosas formado por polietilenoglicol (PEG) e tampão fosfato de potássio. Os autores variaram o tamanho do PEG (400, 1000, 4000 e 6000) e o pH (7,0 e 8,0). Para todas as condições testadas, o fármaco apresentou maior afinidade pela fase rica em PEG, obtendo-se valores de coeficiente de partição de 1,5 a 114 e recuperações que variaram entre 75 e 99%. Os maiores coeficientes de partição

foram obtidos com o aumento da massa molar do PEG, enquanto que um aumento do pH acarretou em maiores recuperações para a fase PEG.

Um estudo da purificação do ácido clavulânico em sistema de par-iônico foi realizado por Mayer *et al.* (1996). Neste sistema, as resinas XAD foram testadas em combinação com sais de amônio quartenário com diferentes polaridades e formando pares iônicos com o grupo ácido do fármaco. Os autores compararam ainda, este sistema com o da resina de troca iônica Amberlite IRA 400, sendo que o primeiro sistema apresentou melhores resultados que o segundo. Os autores concluíram que a cromatografia por sistemas de par-iônico é uma alternativa viável e eficiente na purificação do ácido clavulânico.

Mayer *et al.* (1997) estudaram a difusividade do ácido clavulânico em diferentes sistemas de poros (troca iônica com a resina Amberlite IRA400, carbono ativado e sistema de par-iônico XAD4-ABDA – resina/sal de amônio quartenário) através de experimentos de adsorção em batelada. Os resultados descritos proporcionaram comparações entre os diferentes sistemas de sorção testados para purificação do ácido clavulânico a partir do sobrenadante do meio fermentado. Entre as diferentes matrizes usadas neste estudo, o carvão ativado foi o menos vantajoso devido a sua estrutura microporosa que impede a passagem da biomolécula-alvo. O sistema de par-iônico com a resina XAD4-ABDA apresentou algumas vantagens em relação ao sistema de troca iônica, por ser um sistema com sensibilidade relativamente baixa à variação das condições operacionais. Sua difusividade é menos influenciada pela temperatura, e a presença de componentes competitivos do meio é menos prejudicial à cinética de adsorção, o que leva a um sistema mais seletivo para a purificação do ácido clavulânico.

Alves *et al.* (2002) avaliaram o desempenho da ultrafiltração para isolar o ácido clavulânico de caldos fermentativos industriais. O estudo foi realizado utilizando membranas tubulares de cerâmica de corte 15 e 150 kDa e membranas de folha plana de corte de 20 e 5 kDa, para estabelecer uma sequência de operações para realizar uma separação de fases quando os permeados são sujeitos a extração com solvente. Experimentos de ultrafiltração usando tanto membrana de 15 kDa quanto a de 20 kDa diretamente para separação sólido-líquido mostraram que um bom desempenho pode ser obtido com ambas as membranas. Membranas com altos cortes, como a de 150 kDa,

proporcionam altos fluxos de permeação, mas seus permeados originaram uma separação de fases pobre na operação de extração com solvente, devido à presença de proteínas no permeado. Uma separação com a membrana de corte de 5 kDa, não melhorou o rendimento do processo. Assim, os autores concluíram que o isolamento do ácido clavulânico do meio fermentado usando tecnologia de membrana pode ser realizado com somente dois passos, sendo o primeiro uma separação sólido-líquido por ultrafiltração usando uma membrana com corte de 15 kDa, seguida de concentração por nanofiltração, já que os permeados são geralmente soluções muito diluídas do antibiótico.

Dessa forma, os processos de extração com solvente orgânico seguido de métodos cromatográficos têm, até hoje, sido os mais utilizados para a purificação do ácido clavulânico. Porém, o rendimento relatado por estes processos é geralmente baixo, devido à rápida degradação da biomolécula sob condições normais do processo (Mayer e Deckwer, 1996). Assim, métodos que aumentem o rendimento do processo e diminuam os custos são de grande interesse.

2.3. Processos de Separação e Purificação de Bioprodutos

Os processos de separação e purificação não apresentaram o mesmo grau de desenvolvimento nos últimos anos, quando comparados à otimização dos bioprocessos. Os processos de separação e purificação são constituídos, na sua maioria, de várias etapas com baixos rendimentos tornando os custos altos do ponto de vista industrial. Assim, é de grande interesse o estudo de métodos de purificação e extração alternativos, visando obter processos economicamente mais viáveis (Pessoa-Jr e Kilikian, 2005).

Um desses métodos é a extração líquido-líquido, que consiste em um processo de transferência de um soluto de uma fase líquida para outra fase líquida imiscível em contato com a primeira. A extração líquido-líquido com solventes é empregada para a separação de diferentes substâncias, tais como os antibióticos. Nos últimos anos vêm-se ampliando a utilização dos métodos de extração líquido-líquido em sistemas aquosos com a finalidade de extrair moléculas, sejam elas biologicamente ativas ou não. Para tanto se propõe a adição de polímeros hidrofílicos ou tensoativos não-iônicos às soluções aquosas, levando ao estabelecimento de duas fases imiscíveis (Rangel-Yagui *et al.*, 2003). Nestes processos o conhecimento das relações de equilíbrio de fases, que são baseadas em princípios

termodinâmicos e representadas por diagramas de fases, é fundamental para análises quantitativas das extrações.

Particularmente, o método de separação por Sistemas Micelares de Duas Fases Aquosas (SMDFA) explora a característica que alguns sistemas micelares possuem de que, quando submetidos a determinadas condições, podem espontaneamente se separar em duas fases líquidas aquosas e imiscíveis (Liu *et al.*, 1998). Este sistema possui algumas vantagens em relação a outros métodos de purificação de biomoléculas por extração líquido-líquido, como: proporciona um ambiente favorável e ameno aos materiais biológicos, gera resíduos de baixa toxicidade, permite que a análise das amostras seja feita por diferentes técnicas sem causar interferências, entre outras (Siriname *et al.*, 1998; Quina e Hinze, 1999).

2.3.1. Sistemas Micelares de Duas Fases Aquosas (SMDFA)

Os SMDFA são formados por agentes tensoativos, que são moléculas anfifílicas compostas de uma porção hidrofílica ou polar, comumente denominada “cabeça polar”, e uma porção hidrofóbica ou apolar, comumente denominada “cauda apolar”. Dependendo da natureza química do grupamento da cabeça polar, os tensoativos podem ser classificados em iônicos (catiônicos ou aniônicos), não-iônicos (cabeça polar capaz de realizar ligações de hidrogênio com a água) e zwiteriônicos (cabeça caracterizada por um dipolo) (Israelachvili, 1992). Bis(2-etilhexil) sulfocinato de sódio (AOT), brometo de cetiltrimetil amônio (CTAB), polioxietileno *p-t*-octil fenol (Triton X-114) e dioctanoilfosfatidilcolina (C₈-lecitina) são exemplos de tensoativos aniônico, catiônico, não-iônico e zwiteriônico, respectivamente. A FIGURA 5 apresenta as fórmulas químicas dos tensoativos Triton X-114 e AOT.

AOT

Triton X-114

FIGURA 5. Exemplos de agentes tensoativos aniônico - Bis(2-etilhexil) sulfocinato de sódio (AOT) e não-iônico - polioxietileno *p*-*t*-octil fenol (Triton X-114).

Os tensoativos em solução aquosa podem exibir diversos tipos de comportamento, dependendo da sua concentração. Em soluções contendo o tensoativo em concentração abaixo da concentração micelar crítica (CMC), específica para cada tensoativo, as moléculas adsorvem na interface ar-água, projetando suas caudas apolares em direção à fase ar de forma a minimizar o contato com a água, e portanto, diminuindo a tensão existente nesta interface. Entretanto, a maioria dos tensoativos apresenta solubilidade mínima na fase aquosa, caracterizada pelo caráter hidrofóbico da cauda apolar. Desta forma, em soluções com concentrações de tensoativo superiores à CMC, as moléculas de tensoativo formam agregados conhecidos como micelas, nas quais as caudas hidrofóbicas se associam no interior minimizando o contato com a água e as cabeças polares permanecem na periferia da micela maximizando seu contato com a água (Tanford, 1980; Chevalier e Zemb, 1990).

Ao contrário dos polímeros que são formados por ligação covalente dos monômeros individuais, as micelas são entidades dinâmicas formadas por ligação não-covalente das moléculas de tensoativo (Tanford, 1980; Chevalier e Zemb, 1990), que estão continuamente e reversivelmente trocando monômeros umas com as outras (FIGURA 6), sendo constituídas de dezenas a milhares de monômeros de moléculas de agentes tensoativos (Puvvada e Blankschtein, 1990). Como resultado, a forma e o tamanho da micela pode ser controlado por uma variação das condições da solução, como a concentração e composição (sistemas mistos) dos tensoativos, força iônica, pH e temperatura (Rangel-Yagui *et al.*, 2004).

FIGURA 6. Ilustração esquemática do equilíbrio termodinâmico reversível monômero-micela (baseado em Liu *et al.*, 1996). Micelas se formam em soluções aquosas com concentração de tensoativo acima da CMC, por meio de agregação dos monômeros com as porções apolares constituindo o interior micelar e protegidas do contato com a água, e as cabeças polares constituindo a superfície micelar em contato com a água.

Um balanço complexo de várias forças intermoleculares, incluindo interações de Van der Waals, eletrostáticas, estéricas, hidrofóbicas e de ligações de hidrogênio reflete a formação das micelas (Tanford, 1980; Israelachvili, 1992). A principal força atrativa resulta do efeito hidrofóbico associado às caudas apolares. A força repulsiva contrária é resultado das interações estérica (existente entre as cabeças hidratadas de tensoativos não-iônicos) e eletrostática (existente entre as cabeças que possuem cargas semelhantes) associada às cabeças hidrofílicas. Dessa forma, o processo de micelização é resultado de um balanço entre estas forças atrativas e repulsivas (Kamei, 2001).

O efeito hidrofóbico é governado pelo ganho em entropia que ocorre quando o contato entre as caudas apolares e as moléculas de água é minimizado. Apesar de haver uma perda de entropia translacional das moléculas de tensoativo com a formação das micelas, um aumento significativo da entropia translacional das moléculas de água que rodeiam as caudas hidrofóbicas ocorre. Esse aumento de entropia translacional das moléculas de água tem um efeito maior, pois as moléculas de água encontram-se em maior quantidade (Tanford, 1980).

Em diversos produtos e processos, misturas de tensoativos são utilizadas para aprimorar as propriedades do sistema, formando os chamados sistemas micelares mistos. A adição de um tensoativo carregado no sistema pode melhorar a eficiência da partição. Em determinados casos a interação entre dois tensoativos ocorre de tal forma que a CMC da mistura (CMC_{12}) é um valor intermediário entre as CMC dos dois componentes do sistema (CMC_1 e CMC_2), para qualquer proporção dos dois tensoativos utilizada. Certas misturas de tensoativos, por outro lado, interagem de forma que a CMC_{12} para determinadas proporções dos dois tensoativos é inferior à CMC_1 e CMC_2 (Rosen, 1988; Zhao e Zhu, 1986). A tendência de diferentes tensoativos em formar micelas mistas é governada pelas suas interações atrativas (sinergismo) ou repulsivas (antagonismo) (Vora *et al.*, 1999). A natureza e a força das interações entre dois tensoativos podem ser determinadas através da avaliação de um parâmetro de interação molecular, β^M , definido pela equação 1:

$$\beta^M = \frac{\ln(\alpha_{sol} CMC_{12} / \alpha_{mic,1} CMC_1)}{(1 - \alpha_{mic,1})^2} \quad (\text{equação 1})$$

Em que α_{sol} é a fração molar total de tensoativo 1 em solução (portanto, a fração molar de tensoativo 2 é igual a $1 - \alpha_{sol}$) e $\alpha_{mic,1}$ é a fração molar de tensoativo 1 nas micelas mistas. Como o valor de β^M parece estar relacionado com a energia livre de mistura dos dois tensoativos, um valor negativo indica uma interação do tipo repulsiva. Quanto maior o valor absoluto de β^M , mais forte as interações atrativas ou repulsivas (dependendo do sinal) entre os dois tensoativos. Um valor próximo de zero, por sua vez, indica uma interação muito fraca ou ausência de interação entre os tensoativos, ou seja, uma mistura ideal. Em geral, as misturas de tensoativos apresentam sinergismo na formação de micelas mistas, sendo que a força da interação atrativa entre os tensoativos decresce na seguinte ordem:

aniônico-catiônico > aniônico-zwiteriônico > iônico (catiônico ou aniônico) - não-iônico derivado de polióxido de etileno (POE) > betaína- catiônico > betaína- POE > POE-POE (Rosen, 1988).

Além da CMC, outro parâmetro que caracteriza as micelas é o número de agregação (N_{ag}), que se refere ao número médio de monômeros que constituem cada micela em solução. Neste sentido, dependendo do tipo e concentração de tensoativo, bem como das condições da solução (pH, temperatura, força iônica), micelas podem crescer unidimensionalmente na forma de cilindros ou bicamadas com o número de agregação variando conforme a concentração de tensoativo (Puvvada e Blankschtein, 1990). O crescimento micelar é governado pelas características da cabeça polar das moléculas de tensoativo, uma vez que este fenômeno requer uma proximidade maior entre as cabeças polares. Desta forma, tensoativos iônicos na ausência de sais geralmente apresentam crescimento mínimo, formando micelas esféricas devido à forte repulsão eletrostática entre as cabeças igualmente carregadas. Em contrapartida, tensoativos não-iônicos podem exibir um crescimento significativo, pois a repulsão entre as cabeças é fraca, ocorrendo somente por efeito estérico e não eletrostático (Meguro *et al.*, 1987; Chevalier e Zemb, 1990).

Para determinados tensoativos, como o não-iônico Triton X-114, uma solução micelar isotrópica, homogênea submetida a determinadas condições, por exemplo, aumento de temperatura e adição de sais pode espontaneamente se separar em duas fases líquidas aquosas e imiscíveis. Como a concentração de tensoativos nas duas fases é superior à CMC, micelas estão presentes em ambas as fases. Porém, o tamanho médio e o grau de polidispersão das micelas são diferentes nas duas fases, pois a concentração de tensoativo é diferente (Liu *et al.*, 1998). Em uma das fases, denominada de “regime diluído”, as micelas encontram-se isoladas umas das outras em solução. Na outra, denominada de “regime semidiluído ou concentrado”, as micelas apresentam-se enoveladas formando uma rede. A distinção neste ambiente físico-químico das duas fases formadas consiste na base da utilização destes sistemas em processos de extração de materiais biológicos (Liu *et al.*, 1996; Kamei *et al.*, 2002).

A FIGURA 7 representa esquema de separação de fases do tensoativo não-iônico Triton X-114, na qual a fase inferior é rica em micelas e a fase superior pobre em micelas. As duas fases são predominantemente aquosas, sendo a fase superior composta por no

mínimo 98% (m/m) de água e a fase inferior composta por no mínimo 80% (m/m) de água (Kamei, 2001).

FIGURA 7. Representação esquemática baseada no trabalho de Nikas *et al.*, (1992) de um sistema micelar de duas fases aquosas para o tensoativo não-iônico Triton X-114. O sistema exibe uma única fase a baixas temperaturas; com o aumento da temperatura, se separa em uma fase rica em micelas (fase concentrada) que coexiste com uma fase pobre em micelas (fase diluída).

O fenômeno de separação de fases pode ser representado por uma curva em forma de sino, denominada de *curva binodal* ou *curva de coexistência*, com concavidade para cima ou para baixo, dependendo se a separação de fases é induzida pelo aumento ou queda da temperatura, respectivamente. A curva binodal, desta forma, representa o limite, em função da temperatura e da concentração de tensoativo, no qual a solução micelar se separa em duas fases macroscópicas (Nikas *et al.*, 1992). Para tensoativos não-iônicos da classe dos derivados de óxido de polietileno, como o Triton X-114 e o $C_{10}E_4$, a força atrativa entre as micelas aumenta à medida que a temperatura se eleva (Blankschtein *et al.*, 1986; Chevalier e Zemb, 1990). A FIGURA 8 representa um esboço da curva binodal do SMDFA para o tensoativo não-iônico $C_{10}E_4$.

A separação de fases pode ser entendida com base no fato de que as unidades hidrofílicas de óxido de etileno destes tensoativos ligam-se significativamente às moléculas de água através de ligações de hidrogênio, apresentando-se fortemente hidratadas. Com o aumento da temperatura, a agitação térmica das moléculas em solução aumenta, e, conseqüentemente, as pontes de hidrogênio são enfraquecidas devido ao menor direcionamento das ligações. Desta forma, as micelas são capazes de estabelecer um contato mais próximo entre si, favorecendo interações do tipo atrativas. Estas interações são responsáveis pela formação de uma fase rica em micelas (Blankschtein *et al.*, 1986).

FIGURA 8. Esquema da curva binodal de uma solução aquosa do tensoativo $C_{10}E_4$ baseada no artigo de Liu *et al.* (1996). C_d = concentração do tensoativo na fase pobre em micelas; C_c = concentração do tensoativo na fase rica em micelas; V_c = comprimento do segmento de reta da linha de amarração (*tie-line*) compreendido entre C_d e o valor da concentração total do tensoativo no sistema antes da separação das fases (neste caso 4,12%) e cujo valor é proporcional ao volume da fase rica em micelas; V_d = comprimento do segmento de reta da linha de amarração compreendido entre C_c e o valor da concentração total do tensoativo no sistema antes da separação das fases (neste caso 4,12%) e cujo valor é proporcional ao volume da fase pobre em micelas.

A temperatura na qual ocorre a separação de fases é conhecida como “*cloud-point*” ou “ponto de névoa” e seu valor depende da estrutura, concentração do tensoativo e presença de aditivos. O ponto de névoa dos tensoativos derivados de óxido de etileno eleva-se com o aumento relativo do conteúdo da cadeia de polióxido de etileno e diminui com o aumento da cauda hidrofóbica. Aditivos modificam as interações entre o tensoativo e o

solvente e em consequência pode ocorrer uma mudança na CMC, no tamanho da micela e no comportamento da fase da solução de tensoativo (Jan *et al.*, 2007).

A adição de sais, por exemplo, resulta em interações eletrostáticas com as moléculas de água mais fortes que as interações das pontes de hidrogênio entre a cabeça polar dos tensoativos e a água. As moléculas de água são direcionadas preferencialmente para a solvatação dos íons provenientes do sal e as moléculas anfifílicas interagem e agregam mais entre si do que na ausência do sal, este efeito é conhecido como “salting-out”. Assim, para tensoativos derivados de polióxido de etileno a separação de fases ocorre em temperatura mais baixa, já que a água interage mais com o sal dissociado no meio do que com os monômeros do tensoativo e, conseqüentemente, o ponto de névoa diminui (Zourab *et al.*, 1991; Carale, 1993).

Na presença de pequenas quantidades de tensoativos iônicos, o ponto de névoa de um sistema formado por tensoativos não-iônicos pode aumentar, pois parte destes tensoativos carregados são incorporados as micelas não-iônicas, mudando a superfície da micela e, conseqüentemente, aumentando a repulsão micela-micela devido às cabeças hidrofílicas carregadas, acarretando em uma dificuldade de interação e formação da rede micelar para indução da separação de fases. Por outro lado, o ponto de névoa do sistema micelar misto diminui quando pequenas quantidades de sais inorgânicos são adicionadas ao sistema, porque micelas mistas contêm monômeros iônicos (origem da repulsão eletrostática entre as micelas) que na presença dos eletrólitos diminuem a carga micelar e, conseqüentemente, o ponto de névoa. Se a concentração de eletrólitos é bastante alta, o ponto de névoa pode diminuir drasticamente e um efeito de salting-out ocorrer (Gu e Galera-Gómez, 1995, Nascentes e Arruda, 2003).

Vários compostos vêm sendo purificados e concentrados através do sistema micelar de duas fases aquosas (SMDFA), como albumina, bacteriófagos, antibióticos, colesterol oxidase, glicose-6-fosfato desidrogenase, lisozima, vitaminas lipossolúveis, ácido glicirrízico, nisina, compostos orgânicos e outras proteínas (Cheng-Kang e Wen-Da, 1998; Bordier, 1981; Holm *et al.*, 1986; Nikas *et al.*, 1992; Pryde, 1986; Ramelmeier *et al.*, 1991; Sanchez-Ferrer *et al.*, 1994; Liu *et al.*, 1998; Lee e Su, 1999; Sivars, Tjerneld, 2000; Tani *et al.*, 1998; Chiang, 1999; Quina, Hinze, 1999; Sirimanne *et al.*, 1998; Lopes, 2006; Mazzola *et al.*, 2006; Sun *et al.*, 2007, Jozala *et al.*, 2008).

A partição com sistemas micelares de duas fases aquosas pode se tornar ainda mais seletiva através da utilização de micelas mistas compostas de tensoativos carregados ou tensoativos do tipo ligante de afinidade, misturados com tensoativos não-iônicos (Lee e Su, 1999; Saitoh e Hinze, 1995; Sivers e Tjerneld, 2000). Atrações eletrostáticas entre proteínas carregadas e micelas mistas de carga oposta podem ser exploradas para aumentar o rendimento e a seletividade de sistemas micelares mistos compostos de tensoativos não-iônico e aniônico (Kamei *et al.*, 2002; Rangel-Yagui *et al.*, 2003).

Rangel Yagui (2003) em sua tese de doutorado estudou a partição da glicose-6-fosfato desidrogenase em sistemas micelares não-iônicos e sistemas micelares mistos formados pelos tensoativos $C_{10}E_4$ e $C_{10}E_4/C_nTAB$. A molécula de estudo era uma proteína negativamente carregada e as micelas mistas positivamente carregadas. Os coeficientes de partição da biomolécula nos sistemas mistos foram no mínimo 2,5 vezes maiores que os obtidos no sistema não-iônico correspondente. Demonstrando que os sistemas micelares mistos podem ser considerados uma alternativa para a purificação de proteínas e de outras biomoléculas dependendo de suas características moleculares.

Assim, um sistema composto por micelas mistas de tensoativos não-iônico/aniônico pode resultar na repulsão do ácido clavulânico, molécula negativamente carregada, da fase rica em micelas e ou outras substâncias, como proteínas, presentes no meio fermentado para a fase micelar, o que poderia então ser a base para um processo seletivo de extração deste antibiótico.

3. OBJETIVOS

Estudar a purificação do ácido clavulânico obtido por bioconversão empregando para tanto sistemas micelares mistos (não-iônico/aniônico) de duas fases aquosas formados por dois tensoativos, Triton X-114 e AOT. Para que o objetivo proposto fosse alcançado, os seguintes objetivos específicos foram estabelecidos e cumpridos:

- Obtenção de ácido clavulânico por bioprocesso descontínuo empregando *Streptomyces ssp*;
- Determinação inicial de parâmetros:
 - estabilidade do ácido clavulânico a pH, temperatura, concentração/tipo de sal e concentração dos tensoativos em relação ao tempo;
 - ponto de névoa do sistema Triton X-114/Tampão McIlvaine e do sistema misto Triton X-114/AOT/Tampão McIlvaine;
 - tempo necessário para o estabelecimento do equilíbrio termodinâmico;
- Realização dos experimentos previstos nos planejamentos fatoriais para análise dos sistemas formados pelos tensoativos Triton X-114 e AOT, avaliando as seguintes variáveis: concentração do AOT, concentração do Triton X-114, concentração salina, temperatura;
- Determinação de modelos matemáticos para a extração de ácido clavulânico sobre as condições ótimas empregadas.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Materiais

O tensoativo não-iônico Triton X-114 e o tensoativo aniônico AOT foram obtidos de Sigma™ (St. Louis, MO). O ácido clavulânico na forma de sal potássico foi obtido de duas fontes diferentes: puro da Sigma™ (St. Louis, MO) (99% de pureza) e grau farmacêutico da Galena (54% de pureza). Todos os outros reagentes utilizados foram de grau analítico.

As soluções foram preparadas em Tampão McIlvaine composto de fosfato de sódio dibásico e ácido cítrico em pH 6,5 (1,38 mM de ácido cítrico e 5,3 mM de fosfato de sódio dibásico) e pH 7,2 (1,82 mM de ácido cítrico e 16,37 mM de fosfato de sódio dibásico).

Utilizou-se água deionizada por sistema de purificação de água Millipore tipo Milli-Q (Bedford, MA). Para evitar contaminação com detergentes indesejáveis, toda a vidraria utilizada foi lavada em banho de hidróxido de sódio 1 M em solução alcoólica a 50%, seguido de banho em ácido nítrico 1 M, enxaguada abundantemente com água Milli-Q, e finalmente seca em estufa a 90°C.

4.2. Microrganismo

A linhagem de *Streptomyces clavuligerus* – ATCC 27064, utilizada nesse trabalho, pertence à coleção de microrganismos do Departamento de Antibióticos da UFPE (DAUFPE) e foram cedidas pela Profª Dra. Janete Magali Araújo.

4.3. Meios de cultura

4.3.1. Meios de Esporulação, Manutenção e Reativação

O meio de cultura utilizado para manutenção das linhagens de *S. clavuligerus* foi o meio ISP-2 (Pridham *et al.*, 1957), modificado pela retirada de glicose. A constituição deste meio para um volume final de 100 mL foi de: extrato de levedura (0,4% m/v), extrato de malte (1,0% m/v) e ágar (2,0% m/v).

Para a reativação foi utilizado o meio de cultivo segundo Ortiz *et al.*, (2007) constituído de glicerol (1,5% m/v), peptona bacteriológica (1,0% m/v), extrato de malte (1,0% m/v), extrato de levedura (0,1% m/v), K₂HPO₄ (0,25% m/v), MgSO₄.7H₂O (0,075%

m/v), Tampão MOPS (ácido-3-[N-Morfolino]-propanesulfônico) (2,1% m/v) e 1 mL de solução mineral (100 mg de $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; 100 mg de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 100 mg de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; e água destilada q.s.p. 100 mL). O pH do meio foi ajustado para 6,8 e autoclavado a 121°C durante 30 minutos.

4.3.2. Meio para Produção de Ácido Clavulânico

Com o intuito de se verificar a composição do meio de cultivo que apresentava maior produtividade, três meios diferentes foram analisados para a produção de ácido clavulânico.

Os meios de cultura utilizados para produção de protease foram obtidos por variação do meio de soja (MS), segundo Porto *et al*

O meio denominado como F_1 foi obtido por variação do meio de soja descrito por Porto *et al.* (1996). O meio F_2 foi modificado do meio descrito por Ortiz *et al.* (2007) pela substituição da farinha de soja por extrato de farinha de soja. E o meio F_3 foi formulado a partir do meio F_2 com a substituição do óleo de soja por milhocina. Assim, os meios sofreram pequenas modificações e seus componentes estão descritos na TABELA 2, os valores de pH foram ajustado em 6,8 com solução de NaOH 1 M e autoclavados a 121°C por 30 minutos.

TABELA 2. Meios de cultura F_1 , F_2 e F_3 utilizados para produção de ácido clavulânico.

Componentes	F_1	F_2	F_3
Glicerol (g.L^{-1})	10	10	10
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (g.L^{-1})	0,6	-	-
K_2HPO_4 (g.L^{-1})	4,35	1,2	1,2
$\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (g.L^{-1})	0,001	-	-
Tampão MOPS (g.L^{-1})	-	21	21
Óleo de soja (g.L^{-1})	-	23	-
Milhocina (g.L^{-1})	-	-	23
Extrato de farinha de soja (8% m/v)	250	250	250
(mL.L^{-1}) ⁽¹⁾			
⁽²⁾ Solução Mineral (10 mL.L^{-1})	1	1	1

⁽¹⁾ Metodologia de preparo no Apêndice A; ⁽²⁾ Composição no item 4.3.1.

4.4. Métodos

4.4.1. Manutenção das Amostras

As amostras de *S. clavuligerus* foram mantidas em tubos inclinados contendo meio ISP-2 modificado (descrito no item 4.3.1) incubados a 30°C por 5 a 7 dias e ágar nutriente durante 2 dias a 37°C, respectivamente. Todas as amostras foram repicadas a cada 30 dias. Cepas de *S. clavuligerus* provenientes do meio ISP-2 líquido foram mantidas em 80% de glicerol em *ultrafreezer* (Forma Scientific) à temperatura de -70°C.

4.4.2. Condições de Cultivo

Os experimentos foram realizados em agitador orbital de bancada (Tecnal – TE 420) e consistiram em três etapas: reativação do microrganismo, crescimento e produção. Primeiramente, as cepas congeladas a -70°C em 80% de glicerol foram reativadas no meio de cultivo descrito no item 4.3.1 (frascos Erlenmeyers de 250 mL contendo 25 mL de meio de reativação) por 24 horas a 28°C e 250 rpm, constituindo a fase de ativação celular. Após este período, as culturas foram transferidas assepticamente para outros frascos com um dos meios de cultivo descritos no item 4.3.2 (frascos Erlenmeyers de 250 mL contendo 25 mL de meio de cultivo) e, incubadas em agitador orbital (Barnstead/Thermolyne, modelo 400110) por mais 24 horas, sob as mesmas condições descritas anteriormente.

Na etapa de produção, frascos Erlenmeyers de 500 mL contendo 50 mL de um dos meios descritos no item 4.3.2 receberam inóculo correspondendo a 10% v/v. Os frascos foram incubados por 168 horas, e a cada 24 horas retiraram-se alíquotas, que foram centrifugadas a 3720xg a 5°C por 15 minutos em centrífuga (Jouan BR4i, França). A partir do sobrenadante determinou-se a concentração de ácido clavulânico (metodologia item 4.5.2) e o consumo de glicerol (metodologia item 4.5.3) e este foi congelado em *ultrafreezer* a -70°C para posterior utilização nos ensaios de partição. O precipitado foi utilizado para acompanhar o crescimento celular. O pH das alíquotas foi medido em pHmetro (Mettler-Toledo MPC-227).

4.4.3. Estabilidade do Ácido Clavulânico em Diferentes pHs, Tipos e Concentração de Sais e Temperaturas

Os estudos da estabilidade do ácido clavulânico utilizando Tampão McIlvaine em pH 7,2 e pH 6,5 foram realizados em duas diferentes temperaturas (30 e 45°C). A partir dos resultados obtidos, avaliou-se a estabilidade do fármaco em Tampão McIlvaine pH 6,5 na presença de diferentes sais (NaCl, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) nas concentrações de 0,1 e 0,5 M a 30°C. Para relacionar a degradação do ácido clavulânico com a força iônica do meio, este foi calculado, de acordo com a equação 2 (Pitzer, 1995):

$$\mu = 0.5 \times (C_1 Z_1^2 + C_2 Z_2^2 + \dots C_n Z_n^2) = 0.5 \times \sum_{i=1}^{i=n} C_i \times Z_i^2 \quad (\text{equação 2})$$

Em que: C_i é a concentração molar de cada íon (M), Z_i é a sua carga, sendo que a soma considera todos os íons em solução. Desta forma, a força iônica, μ , é uma função de todos os íons presentes.

Estudou-se, ainda, na condição com 0,1 M de NaCl a estabilidade do antibiótico nas temperaturas de 15, 20, 30 e 45°C. O objetivo foi estabelecer uma faixa de temperatura que minimizasse a perda de ácido clavulânico durante o processo de partição e estudar o comportamento desta biomolécula em diferentes tipos e concentrações de sais.

Em todos os ensaios de estabilidade prepararam-se soluções contendo 30 mg/L de ácido clavulânico, a partir de uma solução estoque (300 mg/L), e tampão nas condições desejadas em tubos de ensaio. As soluções foram homogeneizadas em agitador orbital (Barnstead/Thermolyne, modelo 400110) a 8 rpm por 5 minutos à temperatura ambiente e mantidas em banho termorregulável (Nova Ética, 521/2DE) nas temperaturas desejadas por 24 horas. Nos intervalos de tempos de 0, 3, 6, 9 e 24 horas, alíquotas foram retiradas e a concentração de ácido clavulânico remanescente determinada através da reação com imidazol. A concentração do fármaco obtida no tempo de 0 horas foi considerada como concentração inicial. Todos os experimentos foram realizados em triplicata e os respectivos desvios padrões e intervalos de confiança calculados. A porcentagem de ácido clavulânico presente na solução foi calculada de acordo com a equação 3:

$$Ac(\%) = \frac{Ac_{sol}}{Ac_{ini}} * 100 \quad (\text{equação 3})$$

Em que: Ac corresponde a porcentagem de ácido clavulânico que resistiu ao tratamento, Ac_{sol} à concentração de ácido clavulânico remanescente na solução (mg.L^{-1}), no respectivo intervalo de tempo, e Ac_{ini} é a concentração inicial de ácido clavulânico (mg.L^{-1}).

4.4.4. Estabilidade do Ácido Clavulânico na Presença dos Tensoativos Triton X-114, AOT e do Sistema Triton X-114/AOT

Antes de iniciar os estudos de extração e a partir dos resultados obtidos da estabilidade do ácido clavulânico em diferentes pHs, tipos e concentrações de sais em Tampão McIlvaine (item 4.4.3), foi avaliada a estabilidade do fármaco frente aos tensoativos Triton X-114, AOT e ao sistema misto Triton X-114/AOT em Tampão McIlvaine pH 6,5/NaCl 0,1 M a 20°C (temperatura na qual a solução apresenta-se límpida).

Nestes experimentos, soluções contendo 30 mg/L de ácido clavulânico foram preparadas a partir de uma solução estoque (300 mg/L) em tubos de ensaio e incubadas em banho termorregulável (Nova Ética, 521/2DE) em diferentes condições para cada sistema, conforme TABELA 3.

TABELA 3. Condições dos sistemas contendo tensoativos utilizados para estudo da estabilidade do ácido clavulânico.

Sistemas	Triton X-114 (%m/m)	AOT (mM)*
Triton X-114/Tampão	1, 3, 5, 7 e 9	0
AOT/Tampão	0	0,5, 1,5, 2,5 e 3,5
Triton X-114/AOT/Tampão	1 e 5	0,5 e 1,0

*Adicionados a partir de uma solução estoque de 10 mM.

Todos os sistemas foram homogeneizados por, aproximadamente, 1 hora em agitador orbital (Barnstead/Thermolyne, modelo 400110) à temperatura ambiente. Após a homogeneização as soluções foram colocadas em banho de gelo para tornarem-se límpidas. A concentração de ácido clavulânico nos sistemas foi acompanhada durante um período de 24 horas, sendo retiradas amostras nos tempos de 0, 1, 3, 6 e 24 horas, que foram analisadas conforme metodologia descrita no item 4.5.2. A porcentagem de ácido clavulânico foi

calculada de acordo com a equação 3 (item 4.4.3). Os experimentos foram realizados em triplicata e os respectivos desvios padrões e intervalos de confiança calculados.

4.4.5. Construção das Curvas Binodais para os Sistemas Triton X-114/Tampão e Triton X-114/AOT/Tampão

Para melhor entendimento do comportamento do ácido clavulânico no sistema micelar misto (Triton X-114/AOT/Tampão) de duas fases aquosas é importante conhecer o comportamento do sistema Triton X-114/Tampão. Assim, inicialmente construíram-se as curvas binodais para os sistemas Triton X-114 em diferentes concentrações (0,5, 1,0, 3,0, 5,0, 7,0, 9,0 e 15,0% m/m) em água, Tampão McIlvaine pH 7,2 e pH 6,5. No pH de 6,5, também foram construídas curvas binodais com a adição de NaCl (0,05, 0,10 e 0,50 M), $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0,1 e 0,5 M) e $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,05 e 0,25 M). As curvas binodais para os dois últimos sais foram construídas com o Triton X-114 na concentração de 1, 3, 5, 7 e 9,0% m/m.

A partir dos resultados obtidos de estabilidade do ácido clavulânico e das curvas binodais para o sistema Triton X-114/Tampão foram escolhidas as condições para o sistema misto. Assim, neste sistema a concentração de Triton X-114 foi fixada em 1, 3 e 5% m/m e a de AOT variou (0,25, 0,5, 0,75, 1,00, 1,25 e 1,50 mM) a partir de uma solução estoque (10 mM) em Tampão McIlvaine pH 6,5 sem sal e com a adição de 0,05 e 0,1 M de NaCl.

A curva binodal para todos os sistemas foi determinada de acordo com o método do “ponto de névoa” descrito por Albertsson (1986) e modificado por Blankschtein *et al.* (1986). Este método consiste em identificar visualmente a temperatura, $T_{\text{NÉVOA}}$, na qual soluções com concentrações conhecidas de tensoativo tornam-se turvas com a elevação da temperatura.

Os componentes do sistema micelar foram adicionados em tubos de vidro de separação de 10 mL por pesagem para que se tivesse um sistema de massa total de 3g. A seguir, foram homogeneizados em agitador orbital (Barnstead/Thermolyne, modelo 400110) a 8 rpm por 1 hora, resfriados em banho de gelo de modo a exibir uma única fase e estocados em um banho transparente termorregulável (Nova Ética, 521/2DE) com uma temperatura suficientemente baixa para que o sistema apresentasse uma fase, clara e homogênea. A partir desse ponto, a temperatura foi aumentada lentamente (de 0,02 em

0,02°C) até que a solução se tornasse turva. Esse procedimento foi realizado em triplicata para cada valor de concentração e o ponto de névoa definido como a média dos três valores de temperatura determinados. A curva binodal foi obtida traçando-se os valores de $T_{\text{NÉVOA}}$ em função da concentração do tensoativo.

4.4.6. Estudo da Influência do Meio Fermentado na Curva Binodal do Sistema Misto Triton X-114/AOT/Tampão

A influência da presença do meio fermentado no sistema foi estudada preparando-se o sistema misto em algumas condições que seriam utilizadas no planejamento fatorial, conforme apresentado na TABELA 4. A metodologia de preparo e do procedimento realizado foi idêntica as feitas para o sistema misto sem a presença do meio fermentado (item 4.4.5).

TABELA 4. Condições dos ensaios realizados para analisar a interferência do meio fermentado no ponto de névoa do sistema micelar misto de duas fases aquosas.

Sistema	Triton X-114 (% m/m)	AOT (mM)*	Tampão Mcllvaine pH 6,5
I	5	1	NaCl 0,1M
II	5	0,5	NaCl 0,1M
III	1	1	NaCl 0,1M
IV	1	0,5	NaCl 0,1M
V	5	1	Sem NaCl
VI	5	0,5	Sem NaCl
VII	1	1	Sem NaCl
VIII	1	0,5	Sem NaCl

*Adicionados a partir de uma solução estoque de 10 mM

4.4.7. Partição de Ácido clavulânico no Sistema Triton X-114/AOT/Tampão

Os sistemas micelares mistos de duas fases aquosas foram preparados em tubos de ensaio graduados de 15 mL pela adição por pesagem de Triton X-114, AOT (solução estoque 10 mM), Tampão Mcllvaine e, por último, ácido clavulânico. Nos estudos iniciais (4.4.7.1) utilizou-se ácido clavulânico comercial (Galena) adicionado a partir de uma solução estoque de 300 mg/L, sendo a massa final dos sistemas de 4 g. Nos demais estudos, foi utilizado ácido clavulânico proveniente do meio fermentado e a massa total resultante no sistema foi de 4 e 9 g (em algumas condições a razão entre o volume da fase

superior (diluída) e da fase inferior (concentrada) foi alta, requerendo uma massa maior para se ter quantidade suficiente de amostra na fase inferior para análise espectrofotométrica). Como nesta etapa do trabalho foi utilizado ácido clavulânico proveniente do meio fermentado, as concentrações iniciais variavam devido à perda de estabilidade por estas soluções estarem congeladas e pelo próprio processo de descongelamento, sendo necessária a análise da concentração da biomolécula antes do início das pesagens.

Após a adição dos componentes a homogeneização ocorreu conforme descrito no item 4.4.5. Porém, após esta etapa, os sistemas foram transferidos para um banho de temperatura controlada, com valor previamente ajustado ao valor desejado, e mantidos em repouso pelo tempo determinado. Após este tempo, o volume das fases superior e inferior foi anotado e amostras das duas fases foram coletadas cuidadosamente, com auxílio de seringa e agulha, para análise da concentração de ácido clavulânico conforme descrito no item 4.5.2. A FIGURA 9 apresenta esquematicamente o procedimento experimental de extração por SMDFA.

FIGURA 9. Esquema do procedimento experimental para a extração por SMDFA. 1 – Tubo de ensaio graduado contendo todos os componentes do sistema: tampão, agentes tensoativos e ácido clavulânico – Sistema Monofásico; 2 – Homogeneização do tubo de ensaio durante 1 hora; 3 – Incubação do tubo contendo os componentes da extração à temperatura desejada (variação de $\pm 0,02^{\circ}\text{C}$) pelo tempo desejado em banho termostático; 4 – Tubo contendo as duas fases do sistema, coleta das fases com auxílio de seringa e agulha (no interior do banho) – Sistema Bifásico; 5 – Amostras contendo as fases concentrada e diluída para análises subsequentes da concentração de ácido clavulânico e determinação do coeficiente de partição (K_{AC}) e recuperação na fase diluída do sistema (η_{AC}).

4.4.7.1. Estudos Iniciais

Antes da execução do planejamento fatorial foram realizados dois testes de partição, o primeiro nas seguintes condições: Triton X-114 3% m/m, Tampão McIlvaine pH 6,5 sem adição de sal e AOT em três concentrações diferentes (0,5, 0,75 e 1 mM) por 3 horas, para averiguar qual a fase de maior afinidade pela biomolécula. Posteriormente, investigou-se o efeito do tempo de partição na obtenção do equilíbrio pelo sistema por períodos de 3 e 24 horas, para os tensoativos Triton X-114 (3%) e AOT (0,75 mM) em Tampão McIlvaine pH6,5 sem adição de NaCl e com 0,05 e 0,10 M deste sal a $24,5^{\circ}\text{C}$.

4.4.7.2. Planejamento Fatorial

Empregou-se um planejamento fatorial completo 2^4 com quatro repetições no ponto central para avaliar a influências das variáveis: concentração de AOT (mM), de Triton X-114 (% m/m), de NaCl (M) e a temperatura na extração por sistema micelar misto de duas fases aquosas de ácido clavulânico proveniente de meio fermentado. Os sistemas foram mantidos em repouso por 3 horas. As variáveis estudadas no planejamento foram codificadas em -1, +1 e 0, nível inferior, superior e ponto central, respectivamente. Tanto as variáveis quanto os valores dos níveis foram determinados a partir do levantamento dos parâmetros iniciais. Os ensaios foram realizados em ordem aleatória, de forma a minimizar a ocorrência de erros sistemáticos. Os valores reais das variáveis estudadas constam na TABELA 5 enquanto que a TABELA 6 representa a matriz do planejamento fatorial.

TABELA 5. Níveis utilizados das variáveis avaliadas no planejamento 2^4 com 04 repetições no ponto central.

Variáveis	Níveis Codificados		
	-1	0	+1
AOT (mM)	0,5	0,75	1
Triton X-114 (% m/m)	1	3	5
NaCl (M)	0	0,05	0,1
Temperatura (°C)	24	26	28

TABELA 6. Matriz do planejamento 2^4 com 04 repetições no ponto central para avaliar a influência dos fatores: concentração de AOT, de Triton X-114, de NaCl e temperatura na extração por sistema micelar de duas fases aquosas de ácido clavulânico proveniente de meio fermentado.

Ensaio	VARIÁVEIS			
	AOT (mM)	Triton X-114 (% m/m)	NaCl (M)	Temperatura (°C)
1	+1	+1	+1	+1
2	-1	+1	+1	+1
3	+1	-1	+1	+1
4	-1	-1	+1	+1
5	+1	+1	-1	+1
6	-1	+1	-1	+1
7	+1	-1	-1	+1
8	-1	-1	-1	+1
9	+1	+1	+1	-1
10	-1	+1	+1	-1
11	+1	-1	+1	-1
12	-1	-1	+1	-1
13	+1	+1	-1	-1
14	-1	+1	-1	-1
15	+1	-1	-1	-1
16	-1	-1	-1	-1
17 a 20	0	0	0	0

Os valores das variáveis no planejamento fatorial foram codificados de acordo com a equação 4:

$$V_{COD} = \frac{(V_R - V_O)}{\Delta V_R} \quad (\text{equação 4})$$

Em que: V_{COD} = valor codificado da variável independente; V_R = valor real da variável independente; V_O = valor real da variável independente no ponto central; ΔV_R = valor do passo, isto é $(V_{R_{\text{máx}}} - V_{R_{\text{mín}}})/2$.

4.4.7.3. Experimentos Seriados

Experimentos seriados foram realizados com o intuito de se verificar a influência a concentração do Triton X-114 e do aumento gradativo da concentração do AOT na partição do ácido clavulânico. Para tanto, na primeira série de experimentos a concentração de Triton X-114 foi variável e a de AOT constante (1 mM), assim como, a temperatura

(26°C). Na segunda série, fixou-se a concentração de Triton X-114 em 3% m/m, porém a temperatura sofreu variações em alguns ensaios devido ao aumento da concentração do AOT e antes da partição determinou-se o ponto de névoa dos novos sistemas sem a adição do meio fermentado da mesma maneira descrita no item 4.4.5. Em todos os experimentos utilizou-se Tampão McIlvaine pH 6,5 na ausência de NaCl e o ácido clavulânico proveniente do meio fermentado. As partições foram realizadas conforme descrito no item 4.4.7. As respostas nestes ensaios foram o coeficiente de partição (K_{AC}), a recuperação na fase diluída (η_{AC}) e o balanço de massa (BM_{AC}) calculados a partir das equações apresentadas no item 4.5.5. A TABELA 7 apresenta a sequência dos experimentos realizados.

TABELA 7. Condições dos experimentos seriados na extração de ácido clavulânico proveniente do meio fermentado pelo sistema micelar misto de duas fases aquosas Triton X-114/AOT/Tampão.

Série de Experimentos	Ensaio	AOT (mM)	Triton X-114 (%m/m)	Temperatura (°C)
Primeira	1.1	1	0,2	26
	1.2	1	3	26
	1.3	1	5,8	26
Segunda	2.1	1,25	3	23
	2.2	1,5	3	23
	2.3	2	3	23
	2.4	2,5	3	23
	2.5	3	3	23
	2.6	3,5	3	23
	2.7	4	3	24
	2.8	4,5	3	24
	2.9	5	3	24

4.5. Determinações Analíticas

4.5.1. Determinação da Concentração Celular

A determinação da biomassa foi realizada por massa seca. Após o meio fermentado ser centrifugado, o precipitado foi misturado à água destilada e, posteriormente, repassado para cadinho de porcelana e mantido em estufa (Spencer Scientific MOD I0031) a 90°C até a massa permanecer constante.

4.5.2. Determinação da Concentração de Ácido Clavulânico

A concentração do ácido clavulânico foi determinada pelo método espectrofotométrico proposto por Bird *et al.*, 1982, que se baseia na determinação de um composto oriundo da derivatização do ácido clavulânico com imidazol (FIGURA 10), através da leitura da absorbância em espectrofotômetro a 312 nm. Neste processo, o imidazol reage com o grupo carbonil do anel β -lactâmico rompendo a ligação C-N e formando uma nova ligação C-N entre o imidazol e o carbono do grupo carbonil. A quebra do anel β -lactâmico também leva a abertura do anel oxazolidina com consequentemente descarboxilação. O produto desta reação (I- (8-hidroxi-6-oxo-4-azooct-2-enol)-imidazol) é mais estável que o ácido clavulânico e sua formação é diretamente proporcional à concentração do ácido clavulânico presente na reação.

FIGURA 10. Reação do ácido clavulânico com imidazol.

Foram preparadas duas soluções diferentes (A e B) em tubos de ensaio, com uma dada amostra. Na solução A adicionou-se 0,5 mL de amostra a 2,5 mL de solução de imidazol (8,5 g em 100 mL, pH 6,8), sendo o branco composto pela solução resultante da mistura de 2,5 mL de imidazol e 0,5 mL de água. Na solução B adicionaram-se 2,5 mL de

água deionizada a 0,5 mL de amostra, sendo o branco água deionizada. A solução A foi colocada em banho a 30°C por 15 minutos e, posteriormente, resfriada a 20°C por 5 minutos. Realizou-se a leitura da absorbância de ambas as soluções em espectrofotômetro, Shimadzu UV-1650PC nas soluções que não continham tensoativo e Beckman DU-640 nas soluções com tensoativo, e a absorbância do ácido clavulânico foi expressa pela diferença da absorbância entre as soluções A e B. A curva de calibração de ambos os espectros está apresentada no Apêndice B, assim como, uma descrição da adaptação da metodologia.

$$\text{Absorbância}_{AC} = \text{Absorbância}_{\text{sol. A}} - \text{Absorbância}_{\text{sol. B}}$$

4.5.3. Determinação da Concentração de Glicerol

A concentração de glicerol ao longo do processo fermentativo foi determinada por método colorimétrico como descrito por Bok e Demain (1977). O método é baseado na oxidação do glicerol pelos íons periodato produzindo formaldeído, que ao reagir com Reagente de Nash (acetil-acetona, acetato de amônio e ácido acético glacial) forma 3,5-diacetil-1,4-dihidrolutidina, de coloração amarelada com máximo de absorbância a 412 nm.

Para 1 mL de meio fermentado diluído adicionou-se 1mL de metaperiodato de sódio 0,015 M preparado em HCl 0,12 M. Em seguida, 2 mL de ramnose 0,1% foram adicionados para remover excesso de íons periodato. Após homogeneização, adicionaram-se 4 mL de Reagente de Nash à mistura, que foi homogeneizada e mantida em banho termoregulado a 53°C por 15 minutos. Após resfriamento a absorbância foi medida em espectrofotômetro Shimadzu UV-1650PC. A curva de calibração está apresentada no Apêndice C.

4.5.4. Velocidades Específicas e Produtividade

Para conhecimento das características de cultivo de *S. clavuligerus*, as velocidades específicas de crescimento (μ_X), consumo de substrato (μ_S) e de formação de ácido clavulânico (μ_{AC}) foram calculadas pelo método proposto por Le Duy e Zajic (1973) pelas equações 5, 6 e 7, respectivamente. A produtividade em ácido clavulânico (P_{AC}) também foi calculada pela equação 8.

$$\mu_X = \left(\frac{1}{X} \right) \times \left(\frac{dX}{dt} \right) \quad (\text{equação 5})$$

$$\mu_s = \left(\frac{1}{X} \right) \times \left(\frac{dS}{dt} \right) \quad (\text{equação 6})$$

$$\mu_{AC} = \left(\frac{1}{X} \right) \times \left(\frac{dAC}{dt} \right) \quad (\text{equação 7})$$

Em que: X é a concentração celular (g.L^{-1}); S é a concentração de substrato (g.L^{-1}); AC é a concentração do produto ácido clavulânico (mg.L^{-1}), respectivamente.

$$P_{AC} = \frac{C_P}{t_h} \quad (\text{equação 8})$$

m que: P_{AC} : produtividade em ácido clavulânico ($\text{mg.L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$); C_P : Concentração de ácido clavulânico (mg.L^{-1}).

4.5.5. Análise da Extração

Os resultados obtidos foram analisados inicialmente em termos de coeficiente de partição do, K_{AC} , o qual pode ser expresso por:

$$K_{AC} = \frac{C_d}{C_c} \quad (\text{equação 9})$$

Em que: C_d e C_c correspondem às concentrações da biomolécula (ácido clavulânico) (mg.L^{-1}) na fase pobre em micelas (diluída - d) e na fase rica em micelas (concentrada - c), respectivamente.

Para a partição inicial, os balanços de massa (BM_{AC}) foram calculados de acordo com a expressão:

$$BM_{AC} = \frac{C_c V_c + C_d V_d}{C_i V_i} \times 100\% \quad (\text{equação 10})$$

Em que: C_c , C_d e C_i referem-se às concentrações do componente (ácido clavulânico) (mg.L^{-1}) nas fases rica em micelas (c), pobre em micelas (d) e na solução estoque inicialmente adicionada ao sistema, respectivamente. V_c , V_d e V_i são os volumes das fases (mL) rica em micelas (c), pobre em micelas (d) e da solução estoque inicialmente adicionada ao sistema, respectivamente.

Calculou-se, ainda a recuperação do ácido clavulânico na fase diluída (η_{Ac}), equação 11, que é um parâmetro importante para análise da viabilidade industrial do processo de extração.

$$\eta_{Ac} = \frac{V_d * C_d}{V_i * C_i} * 100 \quad (\text{equação 11})$$

Em que: V_d é o volume da fase pobre em micelas (diluída) (mL); C_d a concentração de ácido clavulânico na fase pobre em micelas (diluída) (mg.L⁻¹); V_t o volume total da solução inicial (mL); C_i a concentração inicial de ácido clavulânico (mg.L⁻¹). Para o planejamento fatorial foram calculados somente os coeficientes de partição (K_{AC}) e a recuperação na fase diluída (η_{Ac}).

Estatística

Todos os experimentos foram realizados em triplicata e os valores obtidos foram apresentados na forma de média ponderada, com os respectivos desvios padrão. O limite de significância para todas as análises estatísticas foi de $\alpha = 0,05$, resultando, portanto em um intervalo de confiança de 95%.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Obtenção de Ácido Clavulânico por Bioprocesso

Foram avaliados os meios denominados F_1 , F_2 e F_3 (item 4.3.2) para a produção de ácido clavulânico em processo descontínuo visando obter maior produtividade, uma vez que o meio fermentado foi submetido aos estudos de extração desta biomolécula.

As FIGURAS 11, 12 e 13 correspondem aos perfis de consumo de glicerol, concentração de biomassa e concentração de ácido clavulânico produzido ao longo do processo para os meios F_1 , F_2 e F_3 , respectivamente.

Ao meio F_1 (FIGURA 11) não foi adicionado óleo de soja e a principal fonte de carbono era o glicerol. Este, ao contrário do ocorrido com os demais meios não foi totalmente consumido durante o processo e ao final das 168 horas restavam 41,1% de

glicerol residual no meio. Provavelmente, o microrganismo consumiu o carbono presente no extrato de farinha de soja para seu crescimento e produção de ácido clavulânico.

FIGURA 11. Concentração de glicerol (■), ácido clavulânico (◆) e biomassa (▲) para o meio F₁, sem a adição de NH₄Cl e extrato de levedura, descrito por Porto *et al.* (1996).

De acordo com a literatura, *S. clavuligerus* apresenta dificuldade para obtenção de energia e fonte de carbono a partir do metabolismo de carboidratos simples como a glicose. Assim, substratos alternativos como dextrina, amido e glicerol têm sido extensivamente utilizados neste bioprocesso (Ortiz *et al.*, 2007). Romero *et al.* (1984) estudaram o papel do glicerol na biossíntese do ácido clavulânico por *S. clavuligerus* sugerindo que o glicerol, convertido a gliceraldeído-3P, é um precursor da unidade do carbono 3 da molécula do ácido clavulânico. Um meio alternativo para manter os níveis de glicerol por longos períodos é o uso de lipídios ao invés de glicerol, como sugerido por Butterworth (1984).

Dessa forma, aos meios F₂ e F₃ foi adicionado óleo de soja. O microrganismo nestes meios utilizou como a fonte de carbono preferencial o glicerol e como pode ser observado nas FIGURAS 12 e 13 após 24 horas 97% e 98,4% deste componente haviam sido consumido. Com 168 horas estas porcentagens não variaram muito, sendo o consumo de glicerol de 98,83% e 99,34% para estes meios. Sendo que então a fonte secundária de carbono (óleo de soja) pode ter sido consumida.

É importante ressaltar que o ácido clavulânico é um metabólito secundário e os fatores envolvidos no controle do seu metabolismo são complexos e de pouca compreensão (Demain e Fang, 1995). Geralmente, sua máxima velocidade de produção é obtida quando

as velocidades de consumo de substrato e de crescimento celular tenham apresentado redução (Schmidell *et al.*, 2001).

FIGURA 12. Concentração de glicerol (■), ácido clavulânico (◆) e biomassa (▲) para o meio F₂, modificado do meio descrito por Ortiz *et al.* (2007) pela substituição da farinha de soja por extrato de farinha de soja.

FIGURA 13. Concentração de glicerol (■), ácido clavulânico (◆) e biomassa (▲) para o meio F₃, modificado do meio F₂ pela substituição de óleo de soja por milhocina.

Com relação à produção de ácido clavulânico, o meio F₂ foi o que proporcionou a maior concentração no tempo de 120 horas (416 mg/L). O meio F₁ produziu 296 mg/L com 96 horas de bioprocesso e o meio F₃ apresentou a menor produção de 280 mg/L após 120 horas de processo. Ao meio F₃ foi adicionado milhocina, um subproduto do processamento do milho contendo 40% de sólidos totais que na literatura é citado como uma alternativa

para suprir o nitrogênio em meios de produção (Silveira *et al.*, 2001), aumentando a concentração de nitrogênio total e possivelmente a produtividade.

Os valores obtidos de concentração de ácido clavulânico em todos os meios estudados foram inferiores aos encontrados na literatura. Ortiz *et al.* (2007), com um meio similar ao F₂, obtiveram concentração de ácido clavulânico próxima a 700 mg/L com 132 horas de processo. Maranesi *et al.* (2005) com o mesmo meio utilizado por Ortiz *et al.* (2007) obtiveram uma concentração de ácido clavulânico de 722 mg/L em 120 horas. Estas diferenças de concentração podem ter ocorrido devido à utilização do extrato de farinha de soja e não da farinha de soja pura, pelas características do microrganismo utilizado, que pode ter seu metabolismo menos ativo e até mesmo pelas condições diversas de trabalho. Porém, como o objetivo do presente projeto é a purificação do ácido clavulânico e não uma otimização de sua produção, as concentrações obtidas são suficientes para utilização no processo de extração.

Mayer e Decker (1996) investigaram a utilização de meios de cultura com farinha de soja ou extrato de farinha de soja como fontes de nitrogênio na produção de ácido clavulânico. Os autores esperavam uma composição inicial em ambos os meios igual ou similar, porém no meio com a farinha de soja a produção foi superior. Como o extrato foi autoclavado para sua preparação e, posteriormente, para esterilização, a concentração dos nutrientes e seus constituintes no meio podem ter se decomposto, ou ainda, a presença de partículas no meio de cultivo pode ter acarretado na formação de hidrolases e proteases extracelulares de *S. clavuligerus*, que poderiam levar a degradação da farinha de soja durante o crescimento e a uma suplementação dos nutrientes essenciais do microrganismo no meio.

Os perfis de curvas apresentados pelas FIGURAS 12 e 13 são similares. Nota-se que a concentração de ácido clavulânico inicia sua ascensão após o glicerol ser praticamente todo consumido. Em contrapartida, na FIGURA 11 não se pode correlacionar o consumo de glicerol com a produção de ácido clavulânico, porque quando há um pico de sua concentração praticamente não ocorre consumo de glicerol. Porém, para os três meios avaliados se observou a mesma característica de queda na produção de ácido clavulânico após determinado tempo de cultivo, sendo esta mais acentuada no meio F₁.

Em relação a variação da concentração de biomassa para os três meios, o cultivo empregando o meio F₂ apresentou a maior concentração celular no tempo de 48 horas com valor em torno de 19 g/L, ao final do processo esta concentração era de 4,9 g/L enquanto que no momento de maior produção de ácido clavulânico (120 horas) sua concentração estava em declínio, aproximadamente 8 g/L. O meio F₃ apresentou perfil semelhante ao do meio F₂, porém o valor máximo concentração celular foi de 13 mg/L também com 48 horas de cultivo. O meio F₁ apresentou baixo crescimento celular e um ligeiro pico com 72 horas de processo. O baixo crescimento pode estar relacionado ao baixo consumo de glicerol observado na utilização deste meio.

Em termos de produção de ácido clavulânico, os meios F₁, F₂ e F₃ continham como principal fonte de carbono o glicerol, pois *S. clavuligerus* apresentam dificuldade para metabolizar carboidratos simples como a glicose. Assim, substratos alternativos como glicerol têm sido extensivamente utilizados em fermentações com este microrganismo. Porém, no meio F₁ o glicerol não foi altamente consumido e seu consumo praticamente cessou no tempo de 96 horas, isso pode ter levado ao baixo crescimento celular obtido por este meio quando comparado aos demais. Já a sua produção apesar das condições adversas foram próximas a 300 mg/L no tempo de 96 horas, produção não reprodutível em ensaios posteriores.

Melhor visualização destes comportamentos pode ser observada na FIGURA 14, que mostra tanto os resultados de concentração de glicerol quanto os de concentração de ácido clavulânico ao longo do cultivo nos meios F₁, F₂ e F₃.

FIGURA 14. Perfis da concentração de glicerol e ácido clavulânico para os meios F₁, F₂ e F₃ ao longo do bioprocesso. (■) F₁-glicerol; (◆) F₁-ácido clavulânico; (*) F₂-glicerol; (●) F₂-ácido clavulânico; (▲) F₃-glicerol; (✱) F₃-ácido clavulânico.

A FIGURA 15 apresenta a variação do pH nos meios avaliados durante o processo descontínuo. Observa-se que o meio F₃, mesmo com a adição de Tampão MOPS, apresentou aumento do valor do pH, atingindo valores superiores aos recomendados como de maior estabilidade do ácido clavulânico, de 6,2 a 6,7 (Bersanetti *et al.*, 2005). Este fato pode estar relacionado a baixa produção deste meio, que Isto pode ter ocorrido com aumento da concentração de amônia, que devido à alta concentração de nitrogênio no meio pode ter apresentado maior produção de amônia (subproduto da fermentação). Assim, à medida que o ácido clavulânico estava sendo formado ele pode também ter sido degradado.

FIGURA 15. Comportamento do pH ao longo do bioprocesso nos meios F₁ (■), F₂ (▲) e F₃ (◆).

Para uma melhor compreensão da cinética do processo fermentativo calcularam-se as velocidades específicas de crescimento (μ_X), de consumo de substrato (μ_S) e de produção de ácido clavulânico (μ_{AC}) para os meios F₁, F₂ e F₃ e os resultados estão apresentados nas FIGURAS 16, 17 e 18, respectivamente.

A partir da FIGURA 16 pode-se observar que para o meio F₁ as maiores velocidades específicas de crescimento e de consumo de substrato foram obtidas no início do processo. A velocidade específica de crescimento se igualou à zero em 72 horas de cultivo enquanto que a de consumo de substrato em 48 horas. Com relação à velocidade específica de produção de ácido clavulânico, um pico foi obtido no tempo de 48 horas, porém, no tempo de 72 horas se observa uma queda até sua velocidade se anular com 96 horas do processo.

FIGURA 16. Variação da velocidade específica de crescimento (μ_X -♦), de consumo de substrato (μ_S -■) e de produção de ácido clavulânico (μ_{AC} -▲) no tempo para o meio F₁, sem a adição de NH₄Cl e extrato de levedura, descrito por Porto *et al.* (1996), ao longo das 168 horas de bioprocesso.

FIGURA 17. Variação da velocidade específica de crescimento (μ_X -♦), de consumo de substrato (μ_S -■) e de produção de ácido clavulânico (μ_{AC} -▲) no tempo para o meio F₂, modificado do meio descrito por Ortiz *et al.* (2007) pela substituição da farinha de soja por extrato de farinha de soja, ao longo das 168 horas de bioprocesso.

FIGURA 18. Variação da velocidade específica de crescimento (μ_x -♦), de consumo de substrato (μ_s -■) e de produção de ácido clavulânico (μ_{AC} -▲) no tempo para o meio F₃, modificado do meio F₂ pela substituição de óleo de soja por milhocina, ao longo das 168 horas de bioprocesso.

Para os meios F₂ (FIGURA 17) e F₃ (FIGURA 18) se observa o mesmo perfil para as velocidades específicas de crescimento celular e de consumo de substrato, que obtiveram seus valores máximos no início do processo, assim como ocorreu para o meio F₁, e, posteriormente, tiveram seus valores igualados a zero nos tempos de 72 e 48 horas, respectivamente, para ambos os meios. Estes meios também apresentaram o mesmo perfil de velocidades específicas de produção, sendo este valor para o meio F₂, aproximadamente, 2 vezes superior ao do F₃. No início do cultivo se observa um aumento na velocidade específica de produção, seguido por um pico no tempo de 96 horas, quando as velocidades específicas de crescimento e de consumo eram nulas, e queda acentuada até seu valor se igualar e permanecer a zero no tempo de 120 horas. Este comportamento é típico de metabolitos secundários, como o ácido clavulânico, pois as células já produziram os metabolitos primários que serão seus precursores (Schmidell *et al.*, 2001).

Com base nos valores apresentados nas FIGURAS 16, 17 e 18, optou-se por limitar o tempo de bioprocesso em 120 horas uma vez que tais resultados evidenciam que as velocidades específicas de crescimento e de consumo de substrato tornam-se nulas decorrido este tempo de bioprocesso, e adicionalmente, um pico de produção foi observado.

A produtividade do ácido clavulânico (P_{AC}), obtidos para os bioprocessos conduzidos com os meios F_1 , F_2 e F_3 foram calculados e são apresentados na TABELA 8.

TABELA 8. Produtividade do ácido clavulânico (P_{AC}) ao longo das 168 horas de bioprocessamento para os meios F_1 , F_2 e F_3 .

Tempo (horas)	P_{AC} (mg/L.h)		
	Meio F_1	Meio F_2	Meio F_3
24	0,08	1,42	1,42
48	1,21	2,04	2,13
72	1,67	2,17	2,36
96	3,08	2,98	2,12
120	2,25	3,47	2,33
144	1,04	2,21	1,77
168	0,48	1,52	1,46

Pode-se observar que os maiores valores de produtividade foram próximos a 3 mg/L.h para o meio F_1 com 96 horas de cultivo, para F_2 o máximo valor foi de 3,47 mg/L.h decorridos 120 horas, e para F_3 a produtividade apresentou valores de máximos em torno de 2 mg/L.h entre os tempos de 48 e de 120 horas de bioprocessamento. Portanto, pode-se dizer que em termos de produtividade o meio F_2 foi mais eficaz.

De uma forma geral, para o meio F_1 o baixo consumo de glicerol e de crescimento celular pode ter influenciado na menor concentração de ácido clavulânico obtida, e consequentemente, a produtividade. Em relação ao meio F_3 , o aumento da concentração de nitrogênio no meio de cultivo não proporcionou aumentos na produtividade e, ao contrário, prejudicou o cultivo. Dessa maneira, o meio F_2 proporcionou os melhores resultados e foi definido como o meio padrão a ser utilizado para a produção de ácido clavulânico e, consequentemente, o meio utilizado no processo de extração.

5.2. Estabilidade do Ácido Clavulânico em Diferentes pHs e Temperaturas

A estabilidade do ácido clavulânico comercial foi determinada em Tampão McIlvaine nos pHs 7,2 e 6,5 e nas temperaturas de 30 e 45°C em diferentes intervalos de tempo ao longo de 24 horas. Os resultados estão apresentados na FIGURA 19.

FIGURA 19. Concentração de ácido clavulânico em Tampão McIlvaine pH 6,5-30°C (▲), pH 6,5-45°C (◆), pH 7,2-30°C (×), pH 7,2-45°C (■) ao longo de 24 horas. As barras de erro correspondem a um intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos.

Como pode ser observado, até 3 horas todas as condições estudadas apresentaram uma porcentagem de ácido clavulânico residual acima de 90%, sendo superior a 95% no pH 6,5 e em torno de 93% para o pH 7,2 em ambas as temperaturas estudadas. No tempo de 6 horas nota-se uma ligeira queda na porcentagem de ácido clavulânico residual, indicando menor estabilidade em pH 7,2 a 45°C. Este perfil se manteve para os demais tempos avaliados e com 24 horas obtiveram-se 69% de ácido clavulânico não degradado nesta condição. Nas demais condições, a porcentagem de ácido clavulânico não degradado se manteve acima de 90% após 6 horas de estudo.

Em pH 6,5 a 45°C no tempo de 9 horas observa-se uma ligeira queda na porcentagem de ácido clavulânico residual, e portanto na estabilidade, em relação a 6 horas. Porém, posteriormente, a porcentagem do ácido manteve-se praticamente constante até o tempo de 24 horas, consequência de sua maior estabilidade, havendo uma perda de 6, 8 e 10% para os tempos de 6, 9 e 24 horas, respectivamente. Este mesmo perfil é notado para o pH 6,5 a 30°C, que ao final do estudo apresentou 5% de ácido clavulânico degradado. A perda obtida nestas condições está inserida na faixa do erro experimental (5%), portanto, pode-se dizer que não houve diferença entre os resultados obtidos.

Em contrapartida, no pH 7,2, ao final do estudo estava presente, aproximadamente, 82 e 69% de ácido clavulânico não degradado nas temperaturas de 30 e 45°C,

respectivamente. Assim, pode-se dizer que a estabilidade do ácido clavulânico quando submetido a valores de pH 7,2 é menor do que a 6,5 nas temperaturas avaliadas.

Nota-se também uma influência da temperatura na estabilidade da biomolécula, sendo esta ação menos acentuada do que a do pH ao se trabalhar em condições ótimas deste parâmetro. Comparando os resultados obtidos a 30°C em pH 6,5 e pH 7,2 observa-se uma perda em torno de 14% a mais no segundo caso, enquanto que uma comparação em pH 6,5 entre as temperaturas de 30 e 45°C acarreta em uma perda de, aproximadamente, 5% na temperatura superior. A maior influência do pH em relação a temperatura na estabilidade da biomolécula pode ser devido a presença em sua estrutura do grupo carbonila do anel β -lactâmico, que é susceptível ao ataque por prótons ou íons hidróxido e pela molécula de água dependendo das condições (Konecny *et al.*, 1975).

Os resultados encontrados estão de acordo com a literatura. Haginaka *et al.* (1981), em estudos da estabilidade do ácido clavulânico em solução aquosa a 35°C, força iônica (μ) de 0,5 M a diferentes pHs (3,15 a 10,10), observaram que sua taxa de degradação é altamente dependente do pH e que seu valor para máxima estabilidade seria, perto de 6,39. Bersanetti *et al.* (2005) ao estudarem a taxa de degradação do ácido clavulânico de várias fontes nos valores de pH de 6,2 e 7,0 mostraram que o ácido clavulânico tem maior estabilidade em pH 6,2 do que 7,0 independente da fonte de ácido clavulânico empregada. Dessa forma, definiu-se o pH 6,5 como padrão do Tampão McIlvaine a ser utilizado nos estudos subsequentes.

5.3. Estabilidade do Ácido Clavulânico em Diferentes Tipos e Concentrações de Sais

A influência de diferentes tipos e concentrações de sais, assim como da força iônica na degradação da molécula de ácido clavulânico em Tampão McIlvaine pH 6,5 a 30°C também foi investigada (FIGURA 20). Este estudo foi realizado visando à escolha de um sal a ser utilizado nos ensaios de extração e ainda, no planejamento fatorial verificar a influência da variável concentração salina nos ensaios de partição. A adição de sais a um tampão aumenta a força iônica do mesmo. Dessa forma, neste estudo a força iônica variou de 0,019 M (sem adição de sal) a 2,019 M (adição de 0,5 M de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$). Os sais utilizados (NaCl , $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) foram selecionados a partir de uma busca na literatura de íons que favoreciam a separação de fases no sistema micelar de duas fases

aquosas (Gu *et al.*, 1989, Koshy *et al.*, 1996, Schott, 1997, Hao *et al.*, 2006, Jan *et al.*, 2007).

FIGURA 20. Concentração de ácido clavulânico em Tampão McIlvaine pH 6,5 sem adição de sal (♦), NaCl 0,1 M (■), NaCl 0,5 M (▲), CaCl₂.2H₂O 0,1 M (×), CaCl₂.2H₂O 0,5 M (*), MgSO₄.7H₂O 0,1 M (●), MgSO₄.7H₂O 0,5 M (+) a 30°C ao longo de 24 horas. As barras de erro correspondem a um intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos.

Pelos resultados apresentados na FIGURA 20, a adição de diferentes tipos de sais sob diferentes concentrações (de 0, 0,1 e 0,5 M) afetou a estabilidade do ácido clavulânico no Tampão McIlvaine, sendo esta degradação mais acentuada na maior concentração salina para todos os sais e inferior a 15% em todas as condições investigadas.

Após 3 horas de exposição, houve uma perda entre 3 e 5% para todos os sais em ambas às concentrações. Após 6 e 9 horas de exposição ao MgSO₄.7H₂O se observou uma queda ligeiramente superior da concentração do ácido, consequência da perda da estabilidade da biomolécula tanto a 0,1 M quanto 0,5 M, enquanto que para o CaCl₂.2H₂O as maiores perdas (9%) foram observadas empregando-se concentração de 0,5 M. Para estes mesmos tempos, a porcentagem do fármaco não degradado empregando NaCl a 0,5 M e CaCl₂.2H₂O a 0,1 M foram próximas a 5 e 6%, respectivamente. Considerando as barras de erro, pode-se dizer que para estes resultados não houve perda ou ela está inserida no erro.

Decorridas 24 horas observa-se uma diferença ligeiramente superior entre os sais em relação à estabilidade da biomolécula, evidenciada pela concentração residual deste no meio. Assim, em comparação ao respectivo tampão sozinho este efeito apresentou a seguinte sequência de magnitude: $\text{NaCl} < \text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O} < \text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$.

Considerando-se as cargas de cada cátion e ânion destes sais, aparentemente, a degradabilidade do fármaco poderia ser função da força iônica. Esta hipótese é confirmada na FIGURA 21, na qual estão representados os valores de porcentagem de ácido clavulânico não degradado em função da força iônica para todos os sais testados nas duas concentrações selecionadas no tempo final de reação de 24 horas.

FIGURA 21. Influência da força iônica na estabilidade do ácido clavulânico em Tampão McIlvaine pH 6,5 a 30°C adicionado de diferentes tipos e concentrações de sais após 24 horas de reação. (0,1 M (●) e 0,5 M (□)).

A porcentagem de ácido clavulânico não degradado foi superior a 85% após 24 horas de exposição, que pode ter acontecido devido a uma reação no meio ou a uma interação entre o sal e o fármaco levando a abertura do anel β -lactâmico e, conseqüentemente, a uma perda da estabilidade. Este parâmetro diminui linearmente com o aumento da força iônica (FIGURA 21) e sofreu influência do tipo de sal. Em particular, a linha reta obtida para a menor concentração salina ($r^2=0,9952$) é caracterizada por um declive aproximadamente 3 vezes ao da concentração maior ($r^2=0,9897$). Isto sugere que a

estabilidade do ácido clavulânico, mensurada em função da concentração remanescente deste no meio, não seguiu uma simples função linear da força iônica, mas que para dado valor este parâmetro é influenciado por outros fatores.

Para todos os sais, um aumento na força iônica como consequência do aumento da concentração salina de 0,1 para 0,5 M acarretou em um pequeno aumento na degradação da biomolécula. No entanto, a intensidade deste efeito variou com o tipo de sal analisado. A fração de ácido clavulânico não degradado aumentou de 6,3 para 7% com NaCl (o que se considerarmos os erros dos experimentos são valores equivalentes), de 9 para 12% com $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e de 11 para 14% com $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ para 24 horas de exposição, em tempos inferiores esta diferença foi bem menos significativa. Estes resultados estão de acordo com aqueles reportados por Laidler (1950), que expressou que a força iônica, para um dado sal, não tem influência relevante na taxa de reação de hidrólise. No entanto, uma comparação direta dos dados com outros apresentados na literatura não é possível uma vez que nestes trabalhos a força iônica tem sido mantida em valores de 0,5 M (Haginaka *et al.*, 1981; Méndez *et al.*, 1992; Bersanetti *et al.*, 2000).

5.4. Estabilidade do Ácido Clavulânico a Diferentes Temperaturas

Na melhor condição obtida no item 5.3 (pH 6.5/ NaCl 0,1 M) foi realizado um estudo da estabilidade do ácido clavulânico variando-se a temperatura em 15, 20, 30 e 45°C, os resultados estão apresentados na FIGURA 22.

FIGURA 22. Concentração de ácido clavulânico em Tampão McIlvaine pH 6,5 com NaCl 0,1M a 15 (♦), 20 (■), 30 (▲) e 45°C (×) ao longo de 24 horas. As barras de erro correspondem a um intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos.

Pode-se observar que sob as menores temperaturas o ácido clavulânico apresentou uma menor taxa de degradação e, como esperado, um maior tempo de exposição proporcionou um aumento na porcentagem de ácido clavulânico degradado, independentemente da temperatura analisada.

Sob a menor temperatura avaliada, 15°C, a máxima perda de ácido clavulânico foi de 2,5% após 24 horas de exposição da biomolécula a esta temperatura. A 20°C, uma baixa taxa de degradação também foi observada e uma perda inferior a 4,5% foi obtida no tempo de 24 horas. Na temperatura de 30°C a porcentagem de ácido clavulânico não degradado foi de 95,9, 95,0 e 93,7% nos tempos de 6, 9 e 24 horas de reação, respectivamente. Enquanto que na maior temperatura investigada (45°C), as perdas foram de 7% para 6 horas de reação, 9% para 9 horas de reação e 13% após 2 horas. Estes resultados estão de acordo com aqueles encontrados por Bersanetti *et al.* 2005, nos quais o ácido clavulânico a pH 6,2 foi mais estável a temperaturas menores. Assim, nos estudos de partição utilizando sistemas micelares mistos de duas fases aquosas tentou-se utilizar as menores temperaturas para diminuir a taxa de degradação da biomolécula.

5.5. Curvas Binodais para os Sistemas Triton X-114/Tampão

Para alcançar objetivo principal deste trabalho, que é a extração do ácido clavulânico, foi necessário determinar preliminarmente o ponto de névoa de soluções de Triton X-114 em água e em Tampão McIlvaine a pH 7,2 e pH 6,5. Por se saber que a presença de sais no sistema pode melhorar a separação de fases e até mesmo a partição dependendo das condições e das características da biomolécula alvo (Zourab *et al.*, 1991; Carale, 1993), nesta última condição foram também investigados os efeitos de diferentes tipos de sais (NaCl, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) e concentrações (0,1 e 0,5 M para os primeiros e 0,05 e 0,25 M para o ultimo).

Os principais resultados destes experimentos são descritos pelas curvas binodais ilustradas na FIGURA 23. Como se sabe, uma curva binodal representa o limite, em função da temperatura e da concentração de tensoativo, no qual uma solução micelar se separa em duas fases macroscópicas (Nikas *et al.*, 1992), sendo a temperatura na qual si inicia a separação de fases conhecida como ponto de névoa e seu valor dependente da presença de sais, alcoóis, tensoativos iônicos e alguns compostos orgânicos (Zulauf, 1991; Yamazaki *et al.*, 1991).

FIGURA 23. Curvas Binodais do sistema Triton X-114 na ausência de sais em água (♦), Tampão McIlvaine pH 7,2 (■), Tampão McIlvaine pH 6,5 (×) e em Tampão McIlvaine pH 6,5 na presença de NaCl 0,1 M (*), NaCl 0,5 M (●), $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,1 M (◆), $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,5 M (▲), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,05 M (■) e $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,25 M (◇). As barras de erro correspondem a um intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos.

Pode-se observar que a adição de sais ao sistema acarretou em um deslocamento da curva binodal, com consequente queda do ponto de névoa e da temperatura necessária para a completa separação de fases, que foi tanto maior quanto maior a concentração de cada sal. A influência dos diferentes tipos de sais no ponto de névoa do Triton X-114 pode ser atribuída aos seus diferentes efeitos de salting-out. Este efeito ocorre quando as moléculas de água do sistema reagem preferencialmente com os íons provenientes do sal e as moléculas de tensoativo interagem e se agregam mais entre si do que na ausência de sal. (Zourab *et al.*, 1991; Carale, 1993).

Em baixas concentrações (0,01 M) muitos eletrólitos não têm efeito significativo no ponto de névoa (Gu e Galera Gomez, 1995). Dessa forma, o deslocamento da curva binodal está relacionado à concentração de eletrólitos no sistema e o tipo de íon adicionado, que pode aumentar ou diminuir o ponto de névoa de acordo com suas características (Ramelmeier *et al.*, 1991). Os íons da série de Hofmeister são classificados quanto a sua atuação na estrutura da água de duas formas (Collins e Washabaugh, 1985): os íons cosmotrópicos (como: sulfato, fosfato, cloreto) aumentam a estrutura da água enquanto que os caotrópicos (como: tiocianato, perclorato) decrescem a estrutura da água deixando o meio aquoso menos hidrofóbico. Os íons adicionados ao sistema no presente trabalho são cosmotrópicos e sua ação se dá justamente acarretando em uma interação mais forte com as moléculas de água do que a interação água-água levando a uma queda no ponto de névoa. A ordem dos sais e concentrações que levaram a esta queda seguiu a seguinte ordem: $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,25 M > NaCl 0,50 M > $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,05 M $\approx$ $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,50 M $\approx$ NaCl 0,10 M > $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,10 M. Sendo que para o primeiro sal ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) houve uma queda de aproximadamente 7°C em relação ao sistema com tampão no mesmo pH.

Estes resultados sugerem que a variação do ponto de névoa pode estar correlacionada à alteração da estrutura da água localizada na superfície da micela. Cátions com maior carga global, sendo altamente hidratáveis, diminuem a concentração de moléculas de água na camada de hidratação, assim permitindo um aumento da interação micela-micela, possibilitando menores temperaturas de ponto de névoa. Assim se explica, por exemplo, a maior queda do ponto de nevoa em presença de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,25 M com relação aos outros dois sais em concentração 100% maior.

O perfil das curvas obtidas está de acordo com os encontrados na literatura para o Triton X-114 (Ramelmeier *et al.*, 1992, Gu e Galera-Gómez, 1995, Koshy *et al.*, 1996, Jozala *et al.*, 2008). Koshy *et al.* (1996) ao estudarem a presença de diversos sais, entre eles o NaCl na curva binodal composta pelos tensoativos não-iônicos Triton X-114 e Triton X-100 observaram um deslocamento similar ao deste estudo. Gu e Galera-Gómez (1995) investigaram o efeito da adição de eletrólitos (0,1 M) em soluções de Triton X-114 em água e encontraram a seguinte a capacidade de diminuir o ponto de névoa: $K_2SO_4 > LaCl_3 > NaCl \approx MgCl_2 > K_3F(CN)_6 > KNO_3$.

Assim, a partir dos resultados obtidos acima e do estudo de estabilidade do ácido clavulânico (item 5.2, 5.3 e 5.4), optou-se por trabalhar com o Tampão McIlvaine pH 6,5 em presença de NaCl. Para utilizar estes resultados nos sucessivos estudos sobre sistema micelar misto, o cenário das curvas binodais foi ampliado executando novos experimentos com maior concentração do tensoativo (até 15% m/m) e menor concentração de NaCl (0,05 M), os quais forneceram, como esperado, pontos de névoa intermediários entre os obtidos em ausência de sal e em presença de NaCl 0,1 M (FIGURA 24).

Estudos com maiores concentrações de sais adicionados ao tampão não foram realizados porque o sistema de partição empregados neste trabalho consiste de sistemas mistos formados por tensoativos não-iônico (Triton X-114) e aniônico (AOT) e optou-se por trabalhar com uma força iônica mais baixa (0,1 M) para poder se observar o efeito do AOT no sistema de partição.

FIGURA 24. Curvas binodais do sistema Triton X-114 em Tampão McIlvaine pH 6,5: ausência de sal (▲); em presença de NaCl 0,05 M (×), NaCl 0,1 M (*), NaCl 0,5 M (●). As barras de erro correspondem a um intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos.

5.6. Curvas Binodais para os Sistemas Triton X-114/AOT/Tampão

As curvas binodais para o sistema misto formado pelo tensoativo não-iônico Triton X-114 e o tensoativo aniônico AOT foram construídas para concentrações fixas de Triton X-114 (1, 3 e 5% m/m) variando-se a concentração de AOT e estão apresentadas de acordo com a concentração de NaCl adicionada ao Tampão McIlvaine pH 6,5. Sabe-se que a formação de micelas para tensoativos tanto não-iônicos como iônicos é governada pela tendência das caudas apolares a evitar o contato com água. Enquanto essa tendência é balanceada no primeiro caso pela hidratação e o espaço requerido pelas cabeças polares (Nascentes e Arruda, 2003), no segundo outro fator determinante é a repulsão eletrostática entre as cabeças polares com carga. Consequentemente, a formação de micelas mistas depende da concentração dos tensoativos iônicos e não-iônicos e de um balanço entre os fatores citados acima.

A FIGURA 25 representa a curva binodal para o tampão sem NaCl, enquanto que a FIGURA 26 e a FIGURA 27 para a adição de 0,05 e 0,10 M de NaCl ao tampão, respectivamente. As concentrações de 3% de Triton X-114 e 0,05 M de NaCl correspondem aos pontos centrais a serem utilizados no planejamento fatorial.

FIGURA 25. Influência da concentração de AOT na curva binodal em Tampão McIlvaine pH 6,5 do sistema misto Triton X-114/AOT na presença de diferentes concentrações de Triton X-114 (1%, $\blacklozenge$; 3%, $\blacksquare$; e 5% m/m, $\blacktriangle$). As barras de erro correspondem a um intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos.

FIGURA 26. Influência da concentração de AOT na curva binodal em Tampão McIlvaine pH 6,5/NaCl 0,05 M do sistema misto Triton X-114/AOT na presença de diferentes concentrações de Triton X-114 (1%, $\blacklozenge$; 3%, $\blacksquare$; e 5% m/m, $\blacktriangle$). As barras de erro correspondem a um intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos.

FIGURA 27. Influência da concentração de AOT na curva binodal em Tampão McIlvaine pH 6,5/NaCl 0,1 M do sistema misto Triton X-114/AOT na presença de diferentes concentrações de Triton X-114 (1%, ♦; 3%, ■; e 5% m/m, ▲). As barras de erro correspondem a um intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos.

Os resultados das FIGURAS 25, 26 e 27 indicam que, inicialmente, na presença concomitante dos dois tensoativos e do tampão ocorre queda no ponto de névoa do sistema misto em todas as situações, tanto na presença como na ausência de NaCl. De acordo com a literatura, quando sais inorgânicos são adicionados a sistemas micelares mistos, eles agem diminuindo a carga micelar e proporcionando uma maior agregação entre as micelas e, consequentemente, um menor ponto de névoa (Nascentes e Arruda, 2003). Ademais, é evidente que o efeito do sal sobre o ponto de névoa do sistema misto foi superior ao do sistema neutro (AOT = 0 mM).

Outro aspecto que vale ressaltar é que, ao se trabalhar com 1% de Triton X-114 sem adição de sal (FIGURA 25) e com 0,05 M de NaCl (FIGURA 26), houve uma clara mudança no perfil da curva a partir de 0,50 e de 0,75 mM de AOT, na primeira e na segunda condição, respectivamente. É importante ressaltar que um aumento da temperatura também ocorreu quando o sistema misto foi preparado em água deionizada. Porém estes dados não foram apresentados porque em algumas concentrações de Triton X-114 e AOT as temperaturas foram superiores a 70°C e, portanto inviáveis para aplicação na presente pesquisa.

Essa mudança pode ser facilmente entendida, pois parte do tensoativo AOT, dotado de carga negativa, é incorporada às micelas não-iônicas, mudando a superfície da micela.

Este fator aumenta a repulsão micela-micela e torna a micela mais hidrofílica, acarretando em uma dificuldade de interação e formação da rede micelar para indução da separação de fases. Por outro lado, quando a concentração de eletrólitos adicionados ao sistema é bastante alta, o ponto de névoa de sistemas mistos pode até mesmo ficar menor do que a da solução de tensoativo não-iônico (Gu e Galera Gomez, 1995). Este fato pôde ser confirmado, pois ao se trabalhar com a maior concentração de sal no sistema (FIGURA 27) o comportamento descrito acima não ocorre e ao contrário, o ponto de névoa cai drasticamente. Porém, em concentrações muito altas de sal uma elevação da temperatura pode ocorrer, pois os mesmos íons que diminuem o ponto de névoa do sistema podem aumentá-lo a partir de certa concentração por introduzir mais carga negativa na superfície da micela devido à solubilização (Nascentes e Arruda, 2003).

Dessa forma, provavelmente o aumento da temperatura para o Triton X-114 1% sem a adição de NaCl, ocorreu porque a concentração de tensoativo carregado no sistema aumentou e a força que prevaleceu foi a de repulsão entre as cabeças carregadas, o que, consequentemente, acarretou em uma elevação do ponto de névoa para este sistema. Este mesmo perfil de curva deve ser obtido se nas demais condições for adicionado AOT.

O comportamento dos demais sistemas foi semelhante, ou seja, à medida que a concentração de AOT aumentava no sistema, menor o ponto de névoa observado. Como esperado, para a maior concentração de Triton X-114 (5%), se observou a menor diminuição do ponto de névoa ao aumentar a concentração de AOT.

Apesar de não constarem na literatura trabalhos efetuados utilizando-se Triton X-114 e AOT, os resultados obtidos neste trabalho estão de acordo com os observados na literatura por vários autores para sistemas micelares mistos (Vora *et al.*, 1999, Fonseca *et al.*, 2007, Zarei, 2007, Javadian *et al.*, 2008).

Por exemplo, Gu e Galera-Gómez (1995) estudaram a adição de pequenas concentrações de SDS (tensoativo aniônico) e CTAB (tensoativo catiônico) em solução com Triton X-114 1% m/m em água. Os autores observaram que a adição de pequenas quantidades de tensoativo iônico (aniônico ou catiônico) tem um drástico efeito no ponto de névoa da solução. A adição de 1 mM de SDS aumentou o ponto de névoa da solução de Triton X-114 1% m/m de 25 para 74°C. A adição de diferentes eletrólitos no ponto de névoa de soluções mistas (Triton X-114/tensoativo carregado). Para a solução formada por

Triton X-114 1% m/m/SDS 1,25 mM em água, os cátions polivalentes foram mais ativos do que os univalentes na seguinte ordem: $\text{LaCl}_3 > \text{MgCl}_2 > \text{NaCl}$ e a temperatura com a adição de 100 mM do primeiro sal diminuiu de 74 para, aproximadamente, 20°C. Similarmente, para a solução micelar Triton X-114 1% m/m/CTAB 1,25 mM, os ânions polivalentes foram mais ativos do que os univalentes, na ordem: $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6 > \text{K}_2\text{SO}_4 > \text{KNO}_3$.

Nascentes e Arruda (2003) observaram um aumento do ponto de névoa de 73 para 98°C quando o tensoativo iônico sódio dodecil sulfato (SDS) foi adicionado ao sistema não-iônico Triton X-100, enquanto que a adição de pequena concentração de NaCl ao sistema misto fez diminuir o ponto de névoa a 56°C. Embora os valores de pontos de névoa obtidos por estes autores sejam muito mais elevados dos obtidos neste trabalho, devido à maior dimensão da cabeça hidrofílica do Triton X-100 em relação ao Triton X-114 (Koshy et al., 1996), também estes autores verificaram que a baixas concentrações do tensoativo não-iônico, mesmo na presença de NaCl, ocorria aumento do ponto de névoa com o aumento da concentração do tensoativo aniônico, de forma qualitativamente similar aos mostrados nas FIGURAS 25 e 26.

Jan *et al.* 2007 avaliaram o comportamento do ponto de névoa do sistema formado pelo tensoativo Triton X-100 sozinho e no sistema misto com o tensoativo aniônico AOT na presença de íons hidrofóbicos fornecidos por diversos carboxilatos de sódio. O ponto de névoa para 10 mM de Triton X-100 em água diminuiu de 67,5 para 60°C com a adição de NaCl 0,1 M, enquanto que aumentou para 82°C com a adição de AOT 0,05 mM. A adição de diferentes concentrações de NaCl ao sistema misto diminuiu o ponto de névoa a medida que se aumentou a concentração do sal (67, 63 e 62°C com 0,005, 0,050 e 0,100 M, respectivamente).

5.7. Estabilidade do Ácido Clavulânico na Presença dos Tensoativos Triton X-114, AOT e do Sistema Triton X-114/AOT

O estudo da estabilidade do ácido clavulânico na presença de diferentes concentrações de Triton X-114 (FIGURA 28) mostrou que os resultados obtidos para 1, 3 e 5% de tensoativo, mantidos temperatura e pH constantes, não apresentaram diferenças significativas entre si ao longo das 24 horas avaliadas. Dessa forma, seus resultados foram

analisados de maneira conjunta. Para comparação dos resultados, utilizou-se um controle constituído apenas de ácido clavulânico e tampão, no qual a temperatura foi mantida a 20°C, para que o sistema se apresentasse na região monofásica, como apresentado no item 5.5 e 5.6.

FIGURA 28. Estabilidade do ácido clavulânico na presença de 0% (♦), 1% (■), 3% (▲), 5% (×), 7% (*) e 9% m/m (●) de Triton X-114 em Tampão McIlvaine pH 6,5/NaCl 0,1 M, durante 24 horas a 20°C. As barras de erro correspondem a um intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos.

Os resultados de ácido clavulânico não degradado tanto no tempo de 1 hora quanto para o de 3 horas foram similares de, aproximadamente, 100% considerando-se o erro experimental. No tempo de 6 horas pode-se observar uma ligeira queda da estabilidade em todas as condições estudadas, mais acentuada quanto maior a concentração de tensoativo, sendo seus valores próximos a 92%. Nas demais concentrações sua porcentagem girou em torno de 95%, valores próximos aos do padrão (96%). No tempo de 24 horas ocorreu uma queda mais acentuada para as concentrações de 7 e 9% de tensoativo, sendo a porcentagem de ácido clavulânico degradado de 11 e 23%, respectivamente, quando comparado a sua concentração inicial, e de 7 e 19% quando confrontado a do padrão. Nas demais condições a porcentagem de ácido clavulânico degradado foi próximo a 7% ao se comparar as concentrações iniciais e de 2% em uma comparação com a solução padrão.

Como pode ser observado, a biomolécula apresentou ser bastante estável frente às menores concentrações de tensoativos analisadas. A pequena perda de estabilidade do ácido

clavulânico frente ao Triton X-114 pode ter ocorrido devido ao tensoativo ser uma molécula não carregada, não atacando o grupo carbonila desta biomolécula. Desta forma, estabeleceu para trabalho nos ensaios de extração as concentrações de 1 e 5% para o Triton X-114. Para determinar as concentrações do tensoativo aniônico (AOT) no sistema micelar misto, o mesmo estudo foi realizado e os resultados são mostrados na FIGURA 29.

FIGURA 29. Estabilidade do ácido clavulânico na presença de 0 (◆), 0,5 (■), 1 (●), 1,5 (▲), 2,5 (×) e 3,5 mM (*) de AOT em Tampão McIlvaine pH 6,5/NaCl 0,1 M, durante 24 horas a 20°C. As barras de erro correspondem a um intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos.

Todas as análises foram realizadas em concentrações do tensoativo aniônico menores a 4 mM (CMC do tensoativo) para assegurar que apenas monômeros estivessem presentes em solução proporcionando uma maior interação entre a cabeça carregada do tensoativo e a biomolécula.

Como pode ser observado na FIGURA 29, o ácido clavulânico mostrou-se mais estável na presença de tensoativo em concentrações de 0,5 a 1,5 mM, sendo nesta faixa, os maiores valores de degradação observados de aproximadamente 10% decorridas 24 horas de exposição, enquanto que nas primeiras horas os valores são praticamente constantes.

Decorridas 6 horas a porcentagem de ácido clavulânico remanescente na presença de 2,5 mM de tensoativo diminuiu para aproximadamente 87% e, com 24 horas para 80%. Ao final de 24 horas, empregando 3,5 mM de tensoativo 24% de ácido clavulânico havia sido degradado. Verificou-se, portanto, uma maior degradação do ácido nas maiores

concentrações de tensoativo, fato este que pode estar relacionado à presença do tensoativo carregado, que pode atacar o grupamento carbonila do ácido clavulânico, inativando o fármaco. Deste modo, optou-se por trabalhar com menores concentrações de tensoativo aniônico, 1 e 0,5 mM, no planejamento experimental.

Como neste trabalho utilizou-se o sistema misto e uma interação entre os tensoativos pode causar uma alteração em sua CMC, assim como, as forças entre a biomolécula e os tensoativos quando comparado a um sistema puro podem sofrer alterações, uma avaliação da estabilidade do fármaco na presença dos tensoativos juntos visando comparar sua perda de estabilidade a dos tensoativos individualmente foi realizada (FIGURA 30).

Para o sistema formado por 1% de Triton X-114 e 0,5mM de AOT com o tempo de 1 hora houve uma perda de 0,8% de ácido clavulânico, e nos tempos de 3, 6 e 24 horas estas perdas foram de 2,87; 3,55 e 3,85%, ao se comparar com os valores do padrão estas perdas foram similares. No sistema com 1,0 mM de AOT e 1% de Triton X-114 as porcentagens de ácido clavulânico não degradado foi de aproximadamente, 98,3, 95,8, 95,03 e 92,37% para os tempos de 1, 3, 6 e 24 horas, respectivamente. Na maior parte destes resultados, os valores obtidos estão inseridos no erro experimental.

FIGURA 30. Estabilidade do ácido clavulânico na presença concomitante de Triton X-114 (%)/AOT (mM) em Tampão McIlvaine pH 6,5/NaCl 0,1 M durante 24 horas a 18°C. [0 / 0 (♦); 1 / 0,5 (○); 1 / 1,0 (▲); 5 / 0,5 (×); 5 / 1,0 (*)]. As barras de erro correspondem a um intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos.

A degradação do ácido clavulânico apresentou um aumento com a concentração de Triton X-114, pois quando este aumentou sua concentração para 5% à perda de estabilidade foi superior àquela observada com 1% deste tensoativo, tanto com o emprego concomitante de 0,5 mM de AOT quanto com 1 mM. Nesta condição, houve queda mais acentuada da estabilidade em ambos os casos e passadas 24 horas de exposição à porcentagem de ácido clavulânico não degradado foi em torno de 90%.

Comparando-se os resultados dos sistemas mistos com os dos tensoativos individualmente, observou-se que todos os valores obtidos foram similares aos do tensoativo aniônico AOT, observando-se assim que ao se trabalhar com um tensoativo carregado a perda da estabilidade pode ser maior devido a um provável ataque à molécula de ácido clavulânico. Os valores obtidos para o tempo de 1 e 3 horas são praticamente os mesmos considerando as barras de erros, tanto entre os sistemas, quanto entre os sistemas e o padrão (sem adição de tensoativos).

Apesar de observar-se um efeito de perda da estabilidade com o aumento da concentração dos tensoativos, praticamente 90% da molécula de ácido clavulânico está na forma não degradada em soluções apresentando concentrações de 1 e 5% de Triton X-114 e 1 e 0,5 mM de AOT. Portanto, os tensoativos Triton X-114 e AOT nas concentrações estudadas não apresentaram alto grau de ligação a molécula do fármaco.

5.8. Estudo da Influência do Meio Fermentado na Curva Binodal do Sistema Misto Triton X-114/AOT/Tampão

Como nas etapas subsequentes deste trabalho o ácido clavulânico utilizado será proveniente do meio fermentado, o qual contém diversas substâncias passíveis de interferência na curva binodal, foi avaliada a interferência da presença do meio fermentado nas curvas binodais obtidas no item 5.6 utilizando algumas condições do planejamento fatorial (TABELA 9). Sabe-se que a presença de qualquer eletrólito pode alterar o ponto de névoa do sistema micelar (Zulauf, 1991; Yamazaki *et al.*, 1991). Por exemplo, Costa (1998) em sua dissertação de mestrado avaliou a influência do meio fermentado contendo a enzima xilanase nas curvas binodais dos diagramas de fases do sistema polimérico de duas fases aquosas formado por PEG de diferentes massas molares versus tampão fosfato pH 8,0 e

observou um deslocamento da curva em direção às baixas concentrações dos componentes que formam as fases.

TABELA 9. Ponto de névoa dos sistemas formados pelos tensoativos Triton X-114 e AOT, Tampão McIlvaine com e sem a presença do meio fermentado. Os erros correspondem a um intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos.

Sistema	Triton X-114 (%m/m)	AOT (mM)	Tampão McIlvaine pH 6,5	Ponto de névoa sem o meio fermentado	Ponto de névoa com o meio fermentado
I	5	1	NaCl 0,1M	21,61 ± 0,02	21,43 ± 0,11
II	5	0,5	NaCl 0,1M	22,41 ± 0,03	22,62 ± 0,21
III	1	1	NaCl 0,1M	14,91 ± 0,04	18,54 ± 0,05
IV	1	0,5	NaCl 0,1M	18,08 ± 0,05	19,32 ± 0,24
V	5	1	Sem NaCl	22,28 ± 0,26	21,93 ± 0,06
VI	5	0,5	Sem NaCl	23,46 ± 0,06	22,69 ± 0,23
VII	1	1	Sem NaCl	21,46 ± 0,16	22,01 ± 0,10
VIII	1	0,5	Sem NaCl	19,81 ± 0,04	20,64 ± 0,29

A presença do meio fermentado acarretou em um aumento do ponto de névoa em algumas condições (III, IV, VII e VIII), porém em outras não alterou o seu valor, considerando os erros. Esta segunda situação ocorreu nos sistemas com maior concentração de Triton X-114, provavelmente, porque em concentrações menores há uma maior dificuldade na formação das micelas pela presença dos interferentes, o que se torna difícil de ocorrer nos sistemas com maiores concentrações de tensoativo pela presença de mais moléculas disponíveis para formação das micelas. Um teste nestes sistemas para verificar se havia separação de fases a 24°C também foi realizado e o resultado obtido foi satisfatório. Dessa forma, essa temperatura e até mesmo temperaturas superiores poderiam ser utilizadas para a partição do ácido clavulânico.

5.9. Partição de Ácido clavulânico no Sistema Triton X-114/AOT/Tampão

5.9.1. Estudos Iniciais

Previamente a execução do planejamento fatorial um teste de partição com o ácido clavulânico comercial (Galena) foi realizado para verificar em qual das fases do sistema micelar misto de duas fases aquosas o ácido clavulânico apresentava maior afinidade. As condições investigadas foram: Triton X-114 3% m/m, Tampão McIlvaine pH 6,5 sem adição de sal e AOT em três concentrações diferentes (0,5, 0,75 e 1 mM). Os resultados do coeficiente de partição (K_{AC}) estão apresentados na FIGURA 31.

FIGURA 31. Coeficientes de partição do ácido clavulânico comercial (K_{AC}) obtidos em sistemas mistos (Triton X-114 3%/AOT) de duas fases aquosas em Tampão McIlvaine pH 6,5 a 24,5°C após 3 horas de reação. As barras de erro correspondem a um intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos.

Os valores de K_{AC} foram superiores a 1 indicando que a biomolécula alvo tem maior afinidade pela fase superior de sistema (fase diluída), visto que este parâmetro foi calculado pela relação entre a concentração de ácido clavulânico obtida na fase diluída pela a da concentrada. Este resultado está de acordo com o esperado, pois a objetivo da adição do tensoativo aniônico foi justamente aumentar a repulsão do ácido clavulânico na fase rica em micelas (inferior) e favorecer sua transferência para a fase superior, uma vez que esta biomolécula apresenta carga negativa. Isto foi feito visando facilitar a recuperação da biomolécula da fase diluída, sem interferência dos tensoativos presentes no sistema, em um

subsequente processo de purificação. Esta afinidade pela fase diluída também pode ser explicada pela estrutura química do fármaco que apresenta características mais hidrofílicas do que hidrofóbicas. Para todos os ensaios, o balanço de massa (BM_{AC}), definido como a percentagem do ácido clavulânico total nas duas fases em relação ao valor inicial, permaneceu próximo de 90% (dados não apresentados).

Lee e Su (1998), estudando a separação com óxido de n-deciltetraetilenos ($C_{10}E_4$) dos ácidos fenilacético e 6-aminopenicilânico, observaram que o segundo composto, que também contém um anel β -lactâmico e é um intermediário muito importante de antibióticos semissintéticos como a ampicilina, migrou para a fase diluída, assim como o ácido clavulânico nos sistemas Triton X-114/AOT.

Posteriormente a investigação com o ácido clavulânico comercial foi realizado um estudo sobre o efeito do tempo de partição (3 e 24 horas) na obtenção do equilíbrio pelo sistema Triton X-114 (3%) e AOT (0,75 mM) em Tampão McIlvaine pH 6,5 na ausência de NaCl e com 0,05 e 0,1 M deste sal a 24,5°C. As concentrações de tensoativos foram escolhidas por serem as concentrações do ponto central no planejamento fatorial. Os três tampões foram utilizados com o objetivo de se ter várias condições para comparação dos tempos, enquanto que a temperatura foi determinada a partir das curvas binodais dos sistemas a serem estudados. Os resultados do K_{AC} e do BM_{AC} estão apresentados nas FIGURAS 32 e 33, respectivamente.

FIGURA 32. Coeficientes de partição do ácido clavulânico do meio fermentado (K_{AC}) obtidos em sistemas mistos (Triton X-114 (3%)/AOT (0,75 mM)) de duas fases aquosas a 24,5°C. As barras cinza e brancas correspondem aos tempos de 3 e 24 horas, respectivamente. As barras de erro correspondem a um intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos.

FIGURA 33. Balanços de massa do ácido clavulânico do meio fermentado (BM_{AC}) obtidos em sistemas mistos (Triton X-114 (3%)/AOT (0,75 mM)) de duas fases aquosas a 24,5°C. As barras cinza e brancas correspondem aos tempos de 3 e 24 horas, respectivamente, e as barras de erro a um intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos.

Em geral, um tempo de extração de 24 horas forneceu valores de K_{AC} inferiores aos de 3 horas e esta diferença foi se acentuando com o aumento da concentração de NaCl. Por outro lado, os resultados de balanço de massa (FIGURA 33) mostram que a porcentagem de

ácido clavulânico não degradado nos sistemas permaneceu sempre acima de 90% e que nem o tempo de extração nem a concentração de NaCl influenciaram significativamente o equilíbrio. Estes resultados estão de acordo com os obtidos no estudo da estabilidade em relação ao sistema Triton X-114/AOT (item 5.7), nos quais esta porcentagem foi em torno de 90% para os sistemas com 3 horas e um mínimo de 86% para o sistema a 24 horas com 5% de Triton X-114 e AOT 1 mM a 18°C em Tampão McIlvaine/NaCl 0,1 M.

Dessa forma, analisando juntamente os resultados apresentados nas Figuras 32 e 33, um tempo de partição de 3 horas foi considerado suficiente para o estabelecimento do equilíbrio e adotado como tempo final de extração nos estudos subsequentes.

5.9.2 Planejamento Fatorial

Para estudar a influência da concentração do tensoativo aniônico AOT (de 0,5, 0,75 e 1 mM), do tensoativo não-iônico Triton X-114 (1, 3 e 5% m/m), da concentração de NaCl (0, 0,05 e 0,1 M) no Tampão McIlvaine pH 6,5 e da temperatura (24, 26 e 28°C) na extração do ácido clavulânico foi empregado um planejamento estatístico fatorial 2^4 completo com 4 repetições no ponto central. Os níveis e variáveis estudadas foram definidos a partir de ensaios prévios de estabilidade do ácido clavulânico frente aos tensoativos e de estudos das curvas binodais do sistema misto. Os níveis reais empregados e os valores obtidos experimentalmente para as variáveis respostas, isto é, o coeficiente de partição (K_{AC}) e a recuperação de ácido clavulânico na fase diluída (η_{AC}), estão apresentados na TABELA 10.

Cabe ressaltar que os ensaios de partição foram realizados com o meio fermentado, que após a fermentação foi centrifugado e o sobrenadante armazenado e conservado a temperatura de -70°C. O efeito da degradação do ácido clavulânico pelo congelamento da amostra, mesmo que pequeno, ficou evidente quando comparada à concentração de ácido clavulânico obtida logo após o término do processo fermentativo. Possíveis taxas de degradação superiores as determinadas nos estudos de estabilidade podem ter ocorrido por estar se trabalhando com o meio fermentado, que devido à presença de outros compostos do meio, como os sais de amônio, podem ter propiciado uma maior degradação da biomolécula (Bersanetti *et al.*, 2005). Porém, a quantificação da concentração de ácido

clavulânico não é prejudicada pela perda, pois sua metodologia de determinação quantifica ácido clavulânico não degradado, ou seja, que tenha a sua estrutura intacta.

TABELA 10. Níveis reais empregados no planejamento fatorial completo 2^4 com 4 repetições no ponto central para avaliação da influência da concentração de AOT, Triton X-114 e NaCl e da temperatura na extração de ácido clavulânico por sistema micelar misto de duas fases aquosas e os valores das variáveis respostas, coeficiente de partição (K_{AC}) e recuperação de ácido clavulânico na fase diluída (η_{AC}), obtidos experimentalmente.

Ensaio	VARIÁVEIS								RESPOSTAS	
	AOT (mM)		Triton X-114 (% m/m)		NaCl (M)		Temperatura (°C)		K_{AC}	η_{AC}
	Cod	Real	Cod	Real	Cod*	Real	Cod	Real		
1	+1	1	+1	5	+1	0,1	+1	28	1,17	60,18
2	-1	0,5	+1	5	+1	0,1	+1	28	1,23	50,93
3	+1	1	-1	1	+1	0,1	+1	28	1,07	92,55
4	-1	0,5	-1	1	+1	0,1	+1	28	1,39	87,18
5	+1	1	+1	5	-1	0	+1	28	1,37	52,40
6	-1	0,5	+1	5	-1	0	+1	28	1,30	51,44
7	+1	1	-1	1	-1	0	+1	28	1,33	83,11
8	-1	0,5	-1	1	-1	0	+1	28	1,48	86,31
9	+1	1	+1	5	+1	0,1	-1	24	1,28	33,51
10	-1	0,5	+1	5	+1	0,1	-1	24	1,34	31,57
11	+1	1	-1	1	+1	0,1	-1	24	1,03	88,12
12	-1	0,5	-1	1	+1	0,1	-1	24	1,30	85,34
13	+1	1	+1	5	-1	0	-1	24	1,63	26,48
14	-1	0,5	+1	5	-1	0	-1	24	2,08	25,41
15	+1	1	-1	1	-1	0	-1	24	1,34	98,71
16	-1	0,5	-1	1	-1	0	-1	24	1,11	83,47
17	0	0,75	0	3	0	0,05	0	26	1,22	79,79
18	0	0,75	0	3	0	0,05	0	26	0,98	72,33
19	0	0,75	0	3	0	0,05	0	26	1,39	78,23
20	0	0,75	0	3	0	0,05	0	26	1,31	72,73

Com base nos resultados apresentados pode-se observar que os maiores valores de K_{AC} foram obtidos para a maior concentração de Triton X-114 e os menores valores de concentração salina e temperatura, independente da concentração de AOT no sistema (ensaio 13 e 14). É importante frisar que, devido às pequenas dimensões das moléculas do ácido clavulânico, um aumento da concentração de Triton X-114 provavelmente não é capaz de provocar o efeito do chamado volume de exclusão, ou seja, a interação repulsiva

estérica, na qual a biomolécula, não encontrando espaço físico, acaba migrando para a fase diluída.

A influência do AOT no sistema foi menor do que o esperado, provavelmente porque as concentrações utilizadas foram baixas para proporcionar uma repulsão eletrostática elevada. Por outro lado, a obtenção de melhores resultados com o emprego de menor concentração salina era esperada, pois a presença de sal no sistema acarreta em uma parcial neutralização da carga micelar deste tensoativo aniônico, levando a uma menor repulsão da biomolécula.

Com relação a η_{AC} , os melhores resultados foram obtidos nos ensaios 15, 3 e 11, 98,71, 92,55 e 88,12%, respectivamente. Estes ensaios têm em comum a concentração de AOT no nível superior (1 mM) e a concentração de Triton X-114 no nível inferior (1% m/m). Uma explicação deste resultado é que, em baixa concentração de Triton X-114, o que prevalece no sistema é o efeito do AOT. Como ambas as fases têm certas características hidrófilas, um incremento da concentração deste tensoativo aniônico leva a uma migração da biomolécula da fase concentrada para a fase diluída como consequência tanto da repulsão eletrostática do fármaco na fase hidrofóbica, como de uma crescente organização estrutural das moléculas de água e sua consequente diminuição da capacidade de solvatação (Zourab *et al.*, 1991) na presença de ambos os tensoativos.

Outro fator que pode ter influenciado nos resultados é a formação, após a separação, dos chamados domínios entre as fases, isto é, “microrregiões” da fase concentrada ou da fase diluída encontradas na interfase do sistema. Neste efeito, como evidenciado por Kamei *et al.* (2002) utilizando o tensoativo não-iônico C₁₀E₄, a razão volumétrica entre as fases ($V_{\text{fase diluída}}/V_{\text{fase concentrada}}$), que neste trabalho variou dependendo das condições selecionadas para o planejamento estatístico, pode ter sido responsável pela ocorrência deste fenômeno.

A análise estatística dos resultados será feita de forma independente. Inicialmente será realizada uma análise em relação ao K_{AC} e, posteriormente, em relação ao η_{AC} . As estimativas dos efeitos, erros-padrão e teste *t* (Student) para o K_{AC} na extração do ácido clavulânico estão apresentadas na TABELA 11.

TABELA 11. Estimativa dos efeitos, erros-padrão e teste t (Student) para K_{AC} na recuperação de ácido clavulânico do meio fermentado por sistema micelar misto de duas fases aquosas.

Efeitos	Estimativas	Erros-padrão	t
Média	1,32	$\pm 0,05$	29,40
Fator A (AOT)	-0,13	$\pm 0,10$	-1,25
Fator B (Triton X-114)	0,17	$\pm 0,10$	1,70
Fator C (NaCl)	-0,23	$\pm 0,10$	-2,25
Fator D (Temperatura)	-0,10	$\pm 0,10$	-0,99
AB	0,002	$\pm 0,10$	0,02
AC	-0,05	$\pm 0,10$	-0,53
AD	0,01	$\pm 0,10$	0,09
BC	-0,11	$\pm 0,10$	-1,11
BD	-0,22	$\pm 0,10$	-2,19*
CD	0,07	$\pm 0,10$	0,72

*Significativo para um intervalo de confiança de 90%.

Valor de t para 90% de confiança com 9 GL. ($t = 1,83$)

Os resultados da análise estatística mostram que os maiores efeitos sobre K_{AC} foram os das concentrações de NaCl e de Triton X-114, que apresentaram estimativas de -0,23 e 0,17, respectivamente. Observa-se ainda que o efeito interativo entre a concentração de Triton X-114 e temperatura também foi elevado (-0,22). Esta interação foi significativa em um intervalo de confiança não superior a 90% provavelmente porque acarretou numa variação da razão entre os volumes das fases. Ademais, seu sinal negativo indica que os valores de K_{AC} podem ser aumentados tanto reduzindo a temperaturas como aumentando a concentração de Triton X-114.

Com o intuito de se verificar a possibilidade de ajuste de um modelo linear aos dados experimentais, conduziu-se uma análise de variância (ANOVA) somente para as variáveis que apresentam efeitos significativos sobre o K_{AC} (TABELA 12).

TABELA 12. Parâmetros da análise de variância (ANOVA) de K_{AC} para os fatores significativos da extração de ácido clavulânico por sistema micelar misto (Triton X-114/AOT) de duas fases aquosas.

Fonte de variação	SQ	GL	QM	Fator - f	Valor - P
Fator A (AOT)	0,062	1	0,062	2,056	0,175
Fator B (Triton X-114)	0,116	1	0,116	3,824	0,072
Fator C (NaCl)	0,204	1	0,204	6,736	0,022*
Fator D (Temperatura)	0,039	1	0,039	1,319	0,271
BC	0,050	1	0,050	1,644	0,222
BD	0,192	1	0,192	6,349	0,026
Erro	0,393	13	0,030		
Erro Total	1,057	19			

*significativo ao nível de 95% de confiança; GL = graus de liberdade; SQ = Soma quadrática; MQ = Média quadrática; $R^2 = 0,73$.

Tanto o fator C (concentração de NaCl) como a interação BD (concentração de Triton X-114/Temperatura) foram significativos no intervalo de confiança de 95%. Enquanto a interação BD (concentração de Triton X-114 e temperatura) discutida anteriormente, a influência significativa da concentração salina (C) era esperada, pois quanto maior a concentração de sal no sistema, maior é sua interação com a cabeça aniônica do AOT, promovendo a repulsão do ácido clavulânico para a fase diluída. Dessa forma, pode-se concluir que é melhor trabalhar sem NaCl no sistema.

A análise realizada, no entanto, apresentou tanto a curvatura quanto falta de ajuste não significativo. O fato do modelo apresentar falta de ajuste não-significativo indica que a diferença entre os valores obtidos experimentalmente e os valores previstos pela equação do modelo pode ser explicada pelo erro experimental.

Desta forma, pôde-se escrever um modelo matemático para representar o processo, o qual pode ser expresso pela equação 12, onde A representa a concentração de AOT, B a concentração de Triton X-114, C a concentração salina, D a temperatura e BC e BD as interações entre os respectivos fatores.

$$K_{AC} = 1,317 - 0,062 \times A + 0,085 \times B - 0,113 \times C - 0,049 \times D - 0,056 \times BC - 0,109 \times BD$$

(equação 12)

A equação 12 prevê valores de 1,4 para o K_{AC} nas seguintes condições: concentração de AOT 0,73 mM, concentração de Triton X-114 3,18% m/m, concentração de NaCl 0,06 M e temperatura 26,1°C. Nestas condições, realizou-se um ensaio em triplicata para confirmar o resultado previsto pelo modelo e obteve-se uma resposta para o $K_{AC} = 1,65 \pm 0,21$, demonstrando que o modelo se adequou razoavelmente aos resultados experimentais. Neste ensaio obteve-se uma η_{AC} de $71,58 \pm 5,96$ %, também superior a muitos resultados obtidos no planejamento fatorial.

A seguir, realizou-se nova análise estatística dos resultados obtidos, desta vez considerando como resposta os valores de recuperação do ácido clavulânico na fase diluída (η_{AC}). Na TABELA 13 são apresentados os valores das estimativas dos efeitos, erros-padrão e teste t (Student) para a η_{AC} na extração do ácido clavulânico.

TABELA 13. Estimativa dos efeitos, erros-padrão e teste t (Student) para η_{AC} na recuperação de ácido clavulânico do meio fermentado por sistemas micelar misto de duas fases aquosas.

Efeitos	Estimativas	Erros-padrão	t
Média	66,99	$\pm 1,79$	37,52
Fator A (AOT)	4,18	$\pm 3,99$	1,05
Fator B (Triton X-114)	-46,61	$\pm 3,99$	-11,68
Fator C (NaCl)	2,76	$\pm 3,99$	0,69
Fator D (Temperatura)	11,44	$\pm 3,99$	2,86
AB	-0,87	$\pm 3,99$	-0,22
AC	0,66	$\pm 3,99$	0,17
AD	-1,08	$\pm 3,99$	-0,27
BC	2,36	$\pm 3,99$	0,59
BD	13,06	$\pm 3,99$	3,27
CD	1,64	$\pm 3,99$	0,41

Valor de t para 90% de confiança com 9 GL. ($t = 1,83$)

Para esta resposta os maiores efeitos foram o da concentração de Triton X-114 (-46,61) e da temperatura (11,44). Em relação ao efeito interativo, ao nível de 95% de significância, obteve-se um valor de 13,06 para a interação entre a concentração de Triton

X-114 e a temperatura. Porém, contrariamente ao visto para o K_{AC} , a interação neste caso apresentou sinal positivo, o que demonstra que para uma maior recuperação de ácido clavulânico na fase diluída o melhor é se trabalhar com os dois fatores no nível superior.

Retirando as interações menos significativas ao processo, realizou-se uma análise de variância (ANOVA) com o intuito de ajustar os dados experimentais a um modelo linear. A TABELA 14 apresenta os parâmetros desta análise.

TABELA 14. Parâmetros da análise de variância (ANOVA) de η_{AC} para os fatores significativos da extração de ácido clavulânico por sistema micelar misto (Triton X-114/AOT) de duas fases aquosas.

Fonte de variação	SQ	GL	QM	Fator - f	Valor - P
Fator A (AOT)	69,76	1	69,76	1,59	0,23
Fator B (Triton X-114)	8689,50	1	8689,50	197,44	$1,2 \cdot 10^{-9}$ *
Fator C (NaCl)	30,39	1	30,39	0,69	0,42
Fator D (Temperatura)	523,15	1	523,15	11,89	0,004*
BD	682,12	1	682,12	15,50	0,002*
Erro	616,14	14	44,01		
Erro Total	10611,07	19			

*significativo ao nível de 95% de confiança; GL = graus de liberdade; SQ = Soma quadrática; MQ = Média quadrática; $R^2 = 0,94$.

O fator mais significativo ($p=1,2 \cdot 10^{-9}$) a este processo foi a concentração de Triton X-114 (B), sendo a melhor condição trabalhar com este fator no nível inferior (1% m/m), o que poderia levar a uma maior concentração de monômeros de AOT promovendo uma maior repulsão. Assim como para K_{AC} , a interação entre temperatura e concentração de Triton X-114 também foi significativa para um intervalo de confiança de 95%. Por outro lado, contrariamente à outra resposta, a temperatura sozinha exerceu um efeito positivo, favorecendo a fase diluída. O modelo não apresentou falta de ajuste e o coeficiente de determinação ($R^2 = 0,94$) indica que 94 % das variações na η_{AC} pelo sistema misto podem ser explicadas pelo modelo.

O modelo matemático para representar o processo obtido para a η_{AC} pode ser expresso pela equação 13, onde A representa a concentração de AOT, B a concentração de

Triton X-114, C a concentração salina, D a temperatura e BD a interação entre os respectivos fatores.

$$\eta_{AC} = 66,989 + 2,088 \times A - 23,304 \times B + 1,378 \times C + 5,718 \times D + 6,529 \times BD \quad (\text{equação 13})$$

A equação 13 prevê $\eta_{AC} = 70,23\%$ para as seguintes condições: concentração de AOT 1,27 mM, concentração de Triton X-114 -43,6% m/m, concentração de NaCl 0,12 M e temperatura 37,44°C. Porém, o valor proposto pelo modelo para o fator B (Triton X-114) é desprovido de significado físico. Sendo este modelo não muito adequado devido à dificuldade de adequação do obtido matematicamente com o que pode ser realizado experimentalmente.

5.9.3. Experimentos Seriados

A partir dos resultados obtidos no planejamento fatorial (item 5.9.2) realizou-se uma série de experimentos seriados de extração do ácido clavulânico proveniente do meio fermentado por sistemas micelares mistos, conforme TABELA 7 apresentada no item 4.4.7.3 de Materiais e Métodos. Nestes experimentos foi utilizado Tampão McIlvaine pH 6,5, optou-se por não adicionar sal ao tampão devido à resposta obtida no planejamento fatorial, no qual a adição de sal foi significativa no nível inferior, ou seja, sem adição deste. Os primeiros experimentos abrangeram novas concentrações de Triton X-114 (0,2, 3,0 e 5,8% m/m) em relação as utilizadas no planejamento fatorial ao sistema formado com AOT 1 mM a 26°C. Os resultados da partição estão apresentados nas FIGURAS 34 e 35 na forma de K_{AC} , BM_{AC} e η_{AC} , respectivamente. Na condição com a menor concentração de Triton X-114 (0,2 % m/m), ensaio 1.1, não houve separação de fases, provavelmente porque nesta condição prevaleceu à força de repulsão entre as cabeças carregadas do tensoativo aniônico, não permitindo a formação das micelas na temperatura utilizada.

FIGURA 34. Coeficientes de partição do ácido clavulânico proveniente do meio fermentado (K_{AC}) obtidos em sistemas micelares mistos (Triton X-114/AOT (1 mM)) de duas fases aquosas em Tampão McIlvaine pH 6,5. As barras de erro correspondem a um intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos.

FIGURA 35. Balanço de Massa (BM_{AC}) e recuperação do ácido clavulânico na fase diluída (η_{AC}) apresentadas pelas barras cinzas e brancas, respectivamente, obtidas em sistemas mistos (Triton X-114/AOT (1 mM)) de duas fases aquosas em Tampão McIlvaine pH 6,5 após 3 horas de reação. As barras de erro correspondem a um intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos.

A maior concentração de Triton X-114 (5,8% m/m) proporcionou um maior K_{AC} , porém menores valores para o BM_{AC} e, principalmente, de η_{AC} foram obtidos. Nesta condição, o volume da fase concentrada foi superior ao da fase diluída o que pode ter levado à baixa $\eta_{AC} = 37\%$, já o menor BM_{AC} pode ter ocorrido porque após a separação de fases a concentração de tensoativo na fase concentrada se tornou muito elevada, o que

levou a maiores perdas da biomolécula. Na condição com Triton X-114 3% m/m o volume da fase concentrada foi inferior ao da fase diluída e a recuperação do ácido clavulânico nesta fase foi de 77%, com K_{AC} próximo a 1,3, e BM_{AC} de, aproximadamente, 100%.

Dessa maneira, o maior coeficiente de partição não compensa o menor balanço de massa e recuperação na fase diluída obtidos ao se trabalhar com Triton X-114 5,8% m/m. Para dar sequência aos estudos investigando agora à influência da concentração do tensoativo aniônico AOT no sistema, utilizou-se o Triton X-114 fixo em 3% m/m. Ao se trabalhar com novas concentrações de AOT o ponto de névoa para o sistema Triton X-114/AOT/Tampão McIlvaine foi determinado e está apresentado na FIGURA 36. As temperaturas utilizadas nestes experimentos foram determinadas a partir deste diagrama.

FIGURA 36. Efeito no ponto de névoa da adição de diferentes concentração de AOT a 3% m/m de Triton X-114 em Tampão McIlvaine pH 6,5. As barras de erro correspondem a um intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos.

Como era esperado, a partir dos resultados apresentados no item 5.6, e pode ser observado pela FIGURA acima, com a adição gradual de AOT ao sistema Triton X-114/Tampão McIlvaine a partir de certa concentração do tensoativo carregado (2 mM) houve um aumento do ponto de névoa. Este fato ocorre, pois o tensoativo aniônico junto ao tensoativo não-iônico se incorpora às micelas não-iônicas, mudando a superfície da micela. Sendo a força que prevalece no sistema é a de repulsão entre as micelas, acarretando em

uma menor interação e dificuldade na formação da rede micelar para indução da separação de fases.

As FIGURAS 37 e 38 representam o K_{AC} , BM_{AC} e η_{AC} na segunda série de experimentos.

FIGURA 37. Coeficientes de partição do ácido clavulânico proveniente do meio fermentado (K_{AC}) obtidos em sistemas micelares mistos (Triton X-114 (3%)/AOT) de duas fases aquosas em Tampão McIlvaine pH 6,5. As barras de erro correspondem a um intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos.

FIGURA 38. Balanço de Massa (BM_{AC}) e recuperação do ácido clavulânico na fase diluída (η_{AC}) apresentadas pelas barras cinzas e brancas, respectivamente, obtidas em sistemas mistos (Triton X-114 (3%)/AOT) de duas fases aquosas em Tampão McIlvaine pH 6,5 após 3 horas de reação. As barras de erro correspondem a um intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos.

Pode-se observar pela FIGURA 37 que um aumento da concentração do tensoativo aniônico acarreta em uma elevação gradativa do K_{AC} (em todas as condições superior a 1), demonstrando que a repulsão eletrostática existente entre o ácido clavulânico e o tensoativo aniônico AOT pode ser uma das forças responsáveis pela migração desta biomolécula para a fase diluída do sistema. A adição de 1,25 mM de AOT levou a um coeficiente de partição de 1,16, enquanto que a adição de 5 mM a um coeficiente de 1,62. Dessa forma, um aumento na concentração do AOT poderia levar a valores superiores aos obtidos, porém deve-se dar atenção a estabilidade do ácido clavulânico a presença dos tensoativos, que nos experimentos realizados apresentaram BM_{AC} (FIGURA 38) acima de 85% em todos os sistemas, sendo as maiores perdas obtidas nas maiores concentrações do tensoativo aniônico. Este resultado era esperado e está de acordo com os obtidos nos estudos de estabilidade frente aos tensoativos (item 5.7), nos quais foi observado que um aumento na concentração destes poderia levar a uma maior perda de estabilidade do fármaco.

Apesar de perdas próximas a 15% em algumas condições, este sistema é vantajoso em relação à degradação do ácido clavulânico se comparado a outros métodos de purificação atualmente utilizados, pois se pode trabalhar na faixa de pH de maior estabilidade do antibiótico, minimizando sua perda. No sistema de extração líquido-líquido utilizando solventes orgânicos para se obter bons resultados inicialmente diminui-se o pH do meio em, aproximadamente, 1,2, com o objetivo de o ácido clavulânico (pI de 2,25) apresentar-se na forma não ionizada e possua em sua estrutura dois grupos hidroxila para interações moleculares através de pontes de hidrogênio. Nestas condições do processo o rendimento relatado geralmente é baixo devido à rápida degradação da biomolécula.

Analisando a recuperação do antibiótico na fase diluída do sistema, os resultados foram acima de 55% e obteve-se um pico próximo a 69% ao se adicionar 4 mM do tensoativo aniônico, mostrando que um aumento na concentração de AOT pode levar a maiores recuperações do ácido clavulânico na fase diluída do sistema. Como este fator é dependente do valor da razão entre os volumes das fases (R), que nestes experimentos foram próximos a 1 em todas as condições (dados não apresentados), aliado aos experimentos de partição deve ser determinado o ponto de névoa para os sistemas e desta forma, tentar trabalhar em uma temperatura na qual o R seja o mais próximo possível de 1.

Brites (2005) em sua dissertação de mestrado estudou a extração líquido-líquido de ácido clavulânico utilizando solventes orgânicos e sistemas poliméricos de duas fases aquosas formados por PEG de diferentes massas moleculares e tampão fosfato. O melhor solvente orgânico para extração foi o *n*-butanol com coeficiente de partição de 1,3, e rendimentos entre 41,8 e 56,89, sendo o melhor pH de extração de 2,0. No sistema polimérico o PEG de menor peso molecular forneceu os maiores rendimentos e em pH 7,0 as maiores perdas. Sendo o coeficiente de partição próximo a 15, porém, o autor apresentou dificuldades em uma próxima etapa de extração para remover o ácido clavulânico da fase polimérica.

Assim, um aumento da concentração do tensoativo aniônico pode levar a melhores valores de coeficiente de partição e, possivelmente, de recuperação na fase diluída ao se aliar as concentrações utilizadas com a temperatura a partir do diagrama de fases.

6. CONCLUSÕES

Estudos da estabilidade do ácido clavulânico no pH de 7,2 e pH 6,5 demonstraram que esta biomolécula apresenta maior estabilidade em pH 6,5, confirmando os resultados encontrados na literatura. A avaliação da estabilidade em relação à presença de tipos e concentrações de sais mostrou que o fármaco apresenta maior estabilidade com NaCl na menor concentração salina estudada. Em relação à temperatura, menores temperaturas proporcionam maior porcentagem de ácido clavulânico não-degradado. Tanto a temperatura quanto a força iônica apresentam menor influência na perda da estabilidade do ácido clavulânico quando comparada ao pH.

Na presença dos tensoativos, o ácido clavulânico apresentou menor estabilidade a maiores concentrações tanto do tensoativo não-iônico quanto a do aniônico, sendo as maiores perdas obtidas de 20% na presença de 3,5 mM do tensoativo AOT e de 23% ao se trabalhar com 9% do Triton X-114, depois de 24 horas de contato em ambas as análises. No sistema misto a mínima porcentagem obtida de ácido clavulânico degradado (após 24 horas) para sistemas formados por 5 ou 1% de Triton X-114 e de 1 ou 0,5 mM de AOT foi de 14%. Dessa forma, no ambiente proporcionado pelo sistema micelar misto de duas fases aquosas a biomolécula não apresentou grandes perdas de estabilidade.

O planejamento fatorial empregado para estudar a partição do ácido clavulânico em sistemas mistos (não-iônico/aniônico) de duas fases aquosas revelou que os melhores valores para a resposta coeficiente de partição ($1,65 \pm 0,21$) obtidos simultaneamente com uma recuperação na fase diluída de $71,58 \pm 5,96\%$ é alcançado com o emprego das seguintes condições sugeridas pelo modelo: concentração de AOT 0,73 mM, concentração de Triton X-114 3,18% m/m, concentração de NaCl 0,06 M e temperatura 26,1°C.

Nos experimentos seriados, um aumento da concentração do tensoativo aniônico no sistema formado por Triton X-114 3% e Tampão McIlvaine pH 6,5 levou a maiores coeficientes de partição. Assim, um aumento da concentração deste tensoativo levaria a maiores valores para este parâmetro e, possivelmente, de recuperação na fase diluída ao se associar as concentrações utilizadas com a temperatura a partir do diagrama de fases.

Desta forma conclui-se que o sistema micelar misto de duas fases aquosas proporciona baixa perda da biomolécula ($BM_{AC} \approx 90\%$) e partição do ácido clavulânico

superior na fase diluída do sistema, o que é uma vantagem pois menores problemas em uma etapa subsequente de purificação, por exemplo, por métodos cromatográficos, podem ocorrer.

Como perspectiva futura, novos estudos com maiores concentrações de AOT podem ser conduzidos para melhorar o coeficiente de partição e a recuperação na fase diluída. Da mesma maneira, que estudos com outros tensoativos podem melhorar a extração do ácido clavulânico.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERTSSON, P.A. *Partition of cell particles and macromolecules: separation and purification of biomolecules, cell organelles, membranes, and cells in aqueous polymer two phase systems and their use in biochemical analysis and biotechnology*. 3.ed. New York: Wiley-Interscience, 1986. 346p.

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

BAGGALEY, K.H.; BROWN, AG.; SCHOFIELD, C.J. Chemistry and biosynthesis of clavulanic acid and others clavams. *Natural Product Reports*, v.14, p.309-333, 1997.

BERSANETTI, P.A.; ALMEIDA, R.M.R.G.; BARBOZA, M.; ARAUJO, M.L.G.C.; HOKKA, C.O. Kinetic studies on clavulanic acid degradation. *Biochemical Engineering Journal*, v.23, p.31-36, 2005.

BERSANETTI, P.A.; BARBOZA, M.; HOKKA, C.O.; ARAUJO, M.L.G.C. Estudos cinéticos de hidrólise do ácido clavulânico. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE FERMENTAÇÕES, 13., Teresópolis, 2000. *Anais*. Teresópolis: Sinaferm, 2000. v.6, 1-39.

BIRD, A.E.; BELLIS, J.M.; GASSON, B.C. Spectrophotometric assay of clavulanic acid by reaction with imidazole. *Analyst*, v.107, p.1241-1245, 1982.

BLANKSCHTEIN, D.; THURSTON, G.M.; BENEDEK, G.B. Phenomenological theory of equilibrium thermodynamic properties and phase separation of micellar solutions. *Journal of Chemical Physics*, v.85, p.7268-7288, 1986.

BOK, S.H.; DEMAINE, A.L. An improved colorimetric assay for polyols. *Analytical Biochemistry*, v.81, p.753-762, 1977.

BORDIER, C. Phase separation of integral membrane proteins in Triton X-114 solution. *Journal of Biological Chemistry*, v.256, p.1604-1607, 1981.

BRADFORD, P.A. Extended-spectrum-lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clinical Microbiology Reviews*, v.14, n.4, p.933-951, 2001.

BRITES, L.M. *Separação e purificação do ácido clavulânico através de extração líquido-líquido seguida de adsorção em coluna de leito fixo*. São Carlos, 2005. 93p. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Engenharia Química – Universidade Federal de São Carlos.

BUTTERWORTH, D. Clavulanic acid: properties, biosynthesis, and fermentation. In: VANDAMME, E.J., ed. *Biotechnology of industrial antibiotics*. New York: Marcel Decker, 1984. p.225-235. (Drugs and the Pharmaceutical Sciences, v.22).

CARALE, M.T.R. *Salt effects on micellization, micellar growth, and phase behavior of aqueous solution of nonionic surfactants*. Cambridge, 1993. 189p. Tese de Doutorado – Massachusetts Institute of Technology.

CHALLIS, G.L.; HOPWOOD, D.A. Synergy and contingency as driving forces for the evolution of multiple secondary metabolite production by *Streptomyces* species. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v.100, p.14555-14561, 2003.

CHARNAS, R.L.; KNOWLES, J.R. Inactivation of RTEM β -lactamase from *Escherichia coli* by clavulanic acid and 9-deoxyclavulanic acid. *Biochemistry*, v.20, n.11, p.3214-3219, 1981.

CHEN, K.C.; LIN, Y.H.; TSAI, C.M.; HSIEH, C.H.; HOUNG, J.Y. Optimization of glycerol feeding for clavulanic acid production by *Streptomyces clavuligerus* with glycerol feeding. *Biotechnology Letters*, v.24, p.455-458, 2002.

CHENG-KANG, L.; WEN-DA, S.U. Separation of phenylacetic acid from 6-aminopenicillanic acid via cloud-point extraction with N-decyltetra(ethylene oxide) nonionic surfactant. *Separation Science and Technology*, v.33, n.7, p.1001-1012, 1998.

CHEVALIER, Y.; ZEMB, T. The structure of micelles and microemulsions. *Reports on Progress in Physics*, v.53, p.279-371, 1990.

CHIANG, C.L. Separation of cholesterol esterase in cloud point extraction system. Separation of cholesterol esterase in cloud point extraction system. *Journal of the Chinese Institute of Chemical Engineers*, v.30, n.2, p.171-176, 1999.

COLE, M.; HOWARTH, T.T.; READING, C. *Process of production of clavulanic acid*. US Pat. 4,110,165, 29 aug. 1978. 23p.

COLLINS, K.D.; WASHABAUGH, M.W. The Hofmeister effect and the behavior of water at interfaces. *Quarterly Reviews of Biophysics*, v.18, n.4, p.323-422, 1985.

COOK, M.A.; CURZONS, A.D.; WILKINS, R.B. *Amine salt of clavulanic acid, its preparation and use*. EP Pat. 0,026,044, 1 abr. 1981. 20p.

COOK, M.A.; WILKINS, R.B. *Preparation or purification of clavulanic acid or its salts or esters*. GB Pat. 2,287,025, 6 set. 1995. 24p.

COSTA, S.A. *Extração líquido-líquido de xilanase em sistema de duas fases aquosas*. Lorena, 1998. 93p. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Engenharia Química de Lorena.

COULTHURST, S.J.; BARNARD, A.M.L.; SALMOND, G.P.C. Regulation and Biosynthesis of carbapenem antibiotics in bacteria. *Nature Reviews Microbiology*, v.3, p.295-306, 2005.

DEMAIN, A.L. Induction of microbial secondary metabolism. *International Microbiology*, v.1, p.259–264, 1989.

DEMAIN, A.L. The business of biotechnology. *Industrial Biotechnology*, v.3, p.269-283, 2007.

ELANDER, R.P. Industrial production of β -lactam antibiotics. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v.61, p.385-392, 2003.

ÉLSON, S.W.; OLIVER, R.S. Studies on the biosynthesis of clavulanic acid. Incorporation of ^{13}C -labeled precursors. *Journal of Antibiotics*, v.31, p.586-592, 1978.

FANG, A.; DEMAİN, A.L. Dependence of nitrogen- and phosphorous-regulation of β -lactam antibiotic production by *Streptomyces clavuligerus* on aeration level. *Journal of Industrial Microbiology*, v.15, p.407-410, 1995.

FINLAY, J.; MILLER, L.; POUPARD, J.A. A review of the antimicrobial activity of clavulanate. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v.52, p.18-23, 2003.

FONSECA, S.M.; EUSÉBIO, M.E.; CASTRO, R.; BURROWS, H.D.; TAPIA, M.J.; OLSSON, U. Interactions between hairy rod anionic conjugated polyelectrolytes and nonionic alkyloxyethylene surfactants in aqueous solution: observations from cloud point behaviour. *Journal of Colloid and Interface Science*, v.315, p.805-809, 2007.

FOULSTONE, M.; READING, C. Assay of amoxicillin and clavulanic acid, components of augmentin, in biological fluids with performance liquid chromatography. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v.22, p.753-762, 1982.

GOUVEIA, E.R.; BAPTISTA-NETO, A.; AZEVEDO, A.G.; BADINO Jr., A.C.; HOKKA, C.O. Improvement of clavulanic acid production by *Streptomyces clavuligerus* in medium containing soybean derivatives. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, v.15, p.623-627, 1999.

GU, T.; QIN, S.; MA, C. The effect of electrolytes on the cloud-point of mixed solutions of ionic and nonionic surfactants. *Journal of Colloid and Interface Science*, v.127, p.586-588, 1989.

GU, T.; GALERA-GÓMEZ, P.A. Clouding of Triton X-114: the effect of added electrolytes on the cloud point of Triton X-114 in the presence of ionic surfactants. *Colloids and Surfaces*, v.104, p.307-312, 1995.

GUTMAN, A.L.; RIBON, V.; BOLTANSKI, A. Incorporation of β -lactam residue of clavulanic acid. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, n.22, p.1627-1629, 1985.

HAGINAKA, J.; NAKAGAWA, T.; UNO, T. Stability of clavulânico acid in aqueous solutions. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, v.29, n.11, p.3334-3341, 1981.

HAO, L.; NAN, Y.; LIU, H.; HU, Y. Salt effects on aqueous cationic/anionic surfactant two-phase regions. *Journal of Dispersion Science and Technology*, v.27, p.271-276, 2006.

HOLM, C.; FREDRIKSON, G.; BELFRAGE, P. Demonstration of the amphiphilic character of hormone-sensitive lipase by temperature-induced phase separation in Triton X-114 and charge-shift electrophoresis. *Journal of Biological Chemistry*, v.261, n.15659-15661, 1986.

ISRAELACHVILI, J.N. *Intermolecular and surface forces*. 2.ed. London: Academic Press, 1992. 540p.

IVES, P.R.; BUSHELL, M.E.; Manipulation of the physiology of clavulanic acid production in *Streptomyces clavuligerus*. *Microbiology*, v.143, p.3573-3579, 1997.

JAN, M.; DAR, A.A.; AMIN, A.; REHMAN, N.; RATHER, G.M. Clouding behavior of nonionic-cationic and nonionic-anionic mixed surfactants systems in presence of carboxylic acids and their sodium salts. *Colloid and Polymer Science*, v.285, p.631-640, 2007.

JAVADIAN, S.; GHARIBI, H.; BROMAND, Z.; SOHRABI, B. Eletrolyte effect on mixed micelle and interfacial properties of binary mixtures of cationic and nonionic surfactants. *Colloid and Interface Science*, v.318, p.449-456, 2008.

JENSEN, S.E.; ELDER, K.J.; AIDOO, K.A.; PARADKAR, A.S. Enzymes catalyzing the early steps of clavulanic acid biosynthesis are encoded by two sets of paralogous genes in *streptomyces clavuligerus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v.44, n.3, p.720-726, 2000.

JONES, C.; THOMPSON, A.; ENGLAND, R. Guanosine 5'-diphosphate 3'-diphosphate (ppGpp) and clavulanic acid production in *Streptomyces clavuligerus*. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, v.13, p.633-636, 1997.

JOZALA, A.F.; LOPES, A.M.; MAZZOLA, P.G.; MAGALHÃES, P.O.; VESSONI PENNA, T.C.; PESSOA Jr., A. Liquid-liquid extraction of commercial and biosynthesized nisin by aqueous two-phase micellar systems. *Enzyme and Microbial Technology*, v.42, p.107-112, 2008.

KHALEELI, N.; LI, R.F.; TOWNSEND, C.A. Origin of the β -lactam carbons in clavulanic acid from unusual thiamine pyrophosphate-mediated reaction. *Journal of the American Chemical Society*, v.121, p.9223-9224, 1999.

KAMEI, D.T. *Protein and viral partitioning in two-phase aqueous micellar systems*. Cambridge, 2001. 316p. Tese de Doutorado - Massachusetts Institute of Technology.

KAMEI, D.T.; KING, J.A.; WANG, D.I.C.; BLANKSCHTEIN, D. Understanding viral partitioning in two-phase aqueous nonionic micellar systems. 2. Effect of entrained micelle-poor domains. *Biotechnology and Bioengineering*, v.78, n.2, p.203-216, 2002.

KONECNY, J.; FELBER, E.; GRUNER, J. Kinetics of hidrolisis of cephalosporin C. *Journal of Antibiotics*, v.26, n.3, p.135-141, 1975.

KONEMAN, E.W.; ALLEN, S.D.; JANDA, W.A.; SCHRECKENBERGER, P.C.; WIM Jr., W.C. *Diagnóstico microbiológico: texto e atlas colorido*. 5.ed. Rio de Janeiro: Medsi, 2001. 1465p.

KOSHY, L.; SAIYAD, A.H.; RAKSHIT, A.K. The effects of various foreign substances on the cloud point of Triton-X100 e Triton-X114. *Colloid and Polymer Science*, v.274, p.582-587, 1996.

LAIDLER, K.J. *Chemical kinetics*. New York: McGraw-Hill, 1950. p.282-294. (International Chemical Series).

LECHEVALIER, H.A.; LECHEVALIER, M.P. Introduction to the order *Actinomycetales*. In: STARR, M.P.; STALP, H.; TRYPER, H.G.; BALAWI, A.; SCHLEGEL, H.G. *The prokaryotes: a handbook on habitats, isolation, and identification of bacteria*. Berlin, New York: Springer-Verlag, 1981.

LE DUY, A.; ZAJIC, J.E. A geometrical approach for differentiation of an experimental function at a point: applied to growth and production. *Biotechnology and Bioengineering*, v.15, p.805-815, 1973.

LEE, C.K.; SU, W.D. Separation of Phnylacetic acid from 6-aminopenicillanic acid via cloud-point extraction with *N*-Decyltetra(ethylene oxide) nonionic surfactant. *Separation Science and Technology*, v.7, n.33, p.1003-1012, 1998.

LEE, C.K.; SU, W.D. Nonionic surfactant-mediated affinity cloud point extraction of vancomycin. *Separation Science and Technology*, v.3, n.16, p.3267-3277, 1999.

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

LIU, C.L.; NIKAS, Y.J.; BLANKSCHTEIN, D. Novel bioseparations using two-phase aqueous micellar systems. *Biotechnology and Bioengineering*, v.52, p.185-192, 1996.

LIU, C.L.; KAMEI, D.T.; KING, J.A.; WANG, D.I.C.; BLANKSCHTEIN, D. Separation of proteins and viruses using two-phase aqueous micellar systems. *Journal of Chromatography, B: Biomedical Science and Applications*, v.711, n.1/2, p.127-138, 1998.

LOPES, A.M. *Purificação da enzima glicose-6-fosfato desidrogenase por sistemas micelares de duas fases aquosas contendo ligantes de afinidade*. São Paulo, 2008. 135p. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo.

LYNCH, H.C.; YANG, Y. Degradation products of clavulanic acid promote clavulanic acid production in cultures of *Streptomyces clavuligerus*. *Enzyme and Microbial Technology*, v.34, p.48-54, 2004.

MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; PARKER, J. *Brock biology of microorganisms*. 8.ed. Upper Saddle River: Prentice Hall, 1997. p.435, 442-445.

MARANESI, G.L.; BAPTISTA NETO, A.; HOKKA, C.O.; BADINO, A.C. Utilisation of vegetable oil in the production of clavulanic acid by *Streptomyces clavuligerus* ATCC 27064. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, v.21, n.4, p.509-514, 2005.

MARTÍN, J.F.; LIRAS, P. Biosynthetic pathways of secondary metabolites in industrial microorganisms. In: REHM, H.J.; REED, G.; eds. *Biotechnology: a comprehensive treatise*. Weinheim: VCH, 1986. v.1, p.211-233. [v.1: Microbial fundamentals].

MAZZOLA, P.G.; LAM, H.; KAVOOSI, M.; HAYNES, C.A.; PESSOA Jr., A.; PENNA, T.C.V.; WANG, D.I.C.; BLANKSCHTEIN, D. Affinity-tagged green fluorescent protein (GFP) extraction from a clarified *E. coli* cell lysate using a two phase aqueous micellar system. *Biotechnology and Bioengineering*; v.93, p.998-1004, 2006.

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

MAYER, A.F.; DECKWER, W.D. Simultaneous production and decomposition of clavulanic acid during *Streptomyces clavuligerus* cultivations. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v.20, p.41-46, 1996.

MAYER, A.F.; HARTMANN R.; DECKWER, W.D. Diffusivities of clavulanic acid in porous sorption systems with ion-pairing. *Chemical Engineering Science*, v.52, n.24, p.4561-4568, 1997.

MEGURO, K.; UENO, M.; ESUMI, K. Micelle formation in aqueous media. In: SCHICK, M.J., ed. *Nonionic surfactants: physical chemistry*. New York: Marcel Dekker, 1987. p.109-183. (Surfactant Science Series, v.23).

MÉNDEZ, R.; ALEMANY, T.; MARTÍN-VILLACORTA, J. Stability in aqueous solution of two monocyclic β -lactam antibiotics: aztreonam and nocardicin A. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, v.40, n.12, p.3222-3227, 1992.

Ministério da Saúde. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/saude/portal/aplicacoes/noticias>. Acesso em: 10 dez. 2008.

NABAIS, A.M.A.; CARDOSO, J.P. Ultrafiltration of fermented broths and solvent extraction of antibiotics. *Bioprocess Engineering*, v.13, p.215-221, 1995.

NAGANO, R.; ADACHI, Y.; IMAMURA, H.; YAMADA, K.; HASHIZUME, T.; MORISHIMA, H. Carbapenem derivatives as potential inhibitors of various beta-lactamases, including class B metallo-beta-lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v.43, n.10, p.2497-2503, 1999.

NAGARAJAN, R.; BOECK, L.D.; GORMAN, M.; HAMILL, R.L.; HIGGENS, C.E.; HOEHN, M.M. Beta-lactam antibiotics from *Streptomyces*. *Journal of the American Chemical Society*, v.93, p.2308-2310, 1971.

NASCENTES, C.C.; ARRUDA, M.A.Z. Cloud point formation based on mixed micelles in the presence of electrolytes for cobalt extraction and preconcentration. *Talanta*, v.61, p.759-768, 2003.

NIKAS, Y.J.; LIU, C.L.; SRIVASTAVA, T.; ABBOTT, N.L.; BLANKSCHTEIN, D. Protein partitioning in two-phase aqueous nonionic micellar solutions. *Macromolecules*, v.25, p.4794-4806, 1992.

OLIVEIRA, P.M.S. *Seleção de Streptomyces spp produtores de inibidores de beta lactamases*. Recife, 2004. p. Dissertação de Mestrado - Programa de Pós Graduação em Biotecnologia de Produtos Bioativos – Universidade Federal de Pernambuco.

OMSTEAD, D.R.; HUNT, G.R.; BUCKLAND, B.C. Commercial production of cephamycin antibiotics. In: BLANCH, H.W.; DREW, S.; WANG, D.I., eds. *Comprehensive biotechnology: the principles, applications and regulations of biotechnology in industry, agriculture and medicine*. Oxford: Pergamon Press, 1985. v.3, p.187-210. [v.3: The practice of biotechnology, speciality products and service activities].

ORTIZ, S.C.A. *Estudo da produção de ácido clavulânico por Streptomyces clavuligerus em diferentes concentrações de lipídeos e de fontes complexas de nitrogênio*. São Carlos, 2005. 74p. Dissertação de Mestrado - Engenharia Química - Universidade Federal de São Carlos.

ORTIZ, S.C.A.; HOKKA, C.O.; BADINO Jr., A.C. Utilization of soybean derivatives on clavulanic acid production by *Streptomyces clavuligerus*. *Enzyme and Microbial Technology*, v.40, p.1071-1079, 2007.

PAMBOUKIAN, C.R.D. *Produção do antitumoral retamicina por Streptomyces olindensis em processos descontínuo, alimentado e contínuo*. São Paulo, 2003. 163p. Tese de Doutorado - Escola Politécnica - Universidade de São Paulo.

PELCZAR, M.J.; CHAN, E.C.S.; KRIEG, N.R. *Microbiologia: conceitos e aplicações*. 2.ed. São Paulo: Makron Books, 1996. v.2, p.116-126.

PESSOA Jr. A.; KILIKIAN, B.V., coord. *Purificação de produtos biotecnológicos*. São Paulo: Manole, 2005. 444p.

PITZER, K.S. Electrolyte solutions: introduction and simple examples. In: *Thermodynamics*. 3.ed. New York: McGraw-Hill, 1995. p.254-274.

PORTO, A.L.F.; CAMPOS-TAKAKI, G.M.; LIMA FILHO, J.L. Effects of culture conditions on protease production by *Streptomyces clavuligerus* growing on the soy bean flour medium. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v.60, p.115-122, 1996.

PRIDHAM, T.G.; ANDERSON, P.; FOLEY, C.; LINDENFELSER, L.A.; HESSELTINE, C.W.; BENEDICT, R.G. A selection of media for maintenance and taxonomic study of *Streptomyces*. *Antibiotics Annual*, p.947–953, 1956/1957.

PRYDE, J.G. Triton X-114: a detergent that has come in from the cold. *Trends in Biochemical Sciences*, v.11, p.160-163, 1986.

PUVVADA, S.; BLANKSCHTEIN, D. Molecular-thermodynamic approach to predict micellization, phase behavior, and phase separation of micellar solutions. I. Application to nonionic surfactants approach. *Journal of Chemical Physics*, v.92, n.6, p.3710-3724, 1990.

QUINA, F.H.; HINZE, W.L. Surfactant-mediated cloud point extractions: an environmentally benign alternative separation approach. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, v.38, n.11, p.4150-4168, 1999.

RAMELMEIER, R.A.; TERSTAPPEN, G.C.; KULA, M.R. The partitioning of cholesterol oxidase in Triton X-114 based aqueous two-phases systems. *Bioseparation*, v.2, p.315-324, 1991.

RANGEL-YAGUI, C.O. *Sistemas micelares de duas fases aquosas aplicados à purificação de enzimas*. São Paulo, 2003. 179p. Tese de Doutorado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo.

RANGEL-YAGUI, C.O.; LAM, H.; KAMEI, D.T.; WANG, D.I.C.; PESSOA Jr., A.; BLANKSCHTEIN, D. Glucose-6-phosphate dehydrogenase partitioning in two-phase aqueous mixed (nonionic/cationic) micellar systems. *Biotechnology and Bioengineering*, v.82, p.445-456, 2003.

RANGEL-YAGUI, C.O.; PESSOA Jr., A.; BLANKSCHTEIN, D. Two-phase aqueous micellar systems: an alternative method for protein purification. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, v.21, n.4, p.531-544, 2004.

READING, C.; COLE, M. Clavulanic acid: a beta-lactamase-inhibiting beta -lactam from *streptomyces clavuligerus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v.11, n.5, p.852-857, 1977.

ROKEM, J.S.; LANTZ, A.E.; NIELSEN, J. Systems biology of antibiotic production by microorganisms. *Natural Product Reports*, v.24, p.1262-1287, 2007.

ROMERO, J.; LIRAS, P.; MARTÍN, J.F. Dissociation of cephamycin and clavulanic acid biosynthesis in *Streptomyces clavuligerus*. *Applied and Environmental Microbiology*, v.20, p.318-325, 1984.

ROMERO, J.; LIRAS, P.; MARTÍN, J.F. Utilization of ornithine and arginine as specific precursors of clavulanic acid. *Applied and Environmental Microbiology*, v.52, p.892-897, 1986.

ROSEN, M.J. *Surfactants and interfacial phenomena*. 2.ed. New York: John Wiley, 1988. 431p.

SAITOH, T.; HINZE, W.L. Use of surfactant-mediated phase separation (cloud-point extraction) with affinity ligands for the extraction of hydrophilic proteins. *Talanta*, v.42, n.1, p.119-127, 1995.

SANCHEZ-FERRER, A.; BRU, R.; GARCIA-CARMONA, F. Phase separation of biomolecules in polyoxyethylene glycol nonionic detergents. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, v.29, n.4, p.275-313, 1994.

SAUDAGAR, P.S.; SINGHAL, R.S. Optimization of nutritional requirements and feeding strategies for clavulanic acid production by *Streptomyces clavuligerus*. *Bioresource Technology*, v.98, p.2010-2017, 2007.

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

SCHMIDELL, W.; LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W., coords. *Biotechnologia industrial: engenharia bioquímica*. São Paulo: Edgard Blucher, 2001. v.2, p.93-121.

SCHOTT, H. Effect of inorganic additives on solutions of nonionic surfactants. *Journal of Colloid and Interface Science*, v.189, p.117-122, 1997.

SILVEIRA, M.M.; WISBECK, E.; HOCH, I.; JONAS, R. Production of glucose-fructose oxidoreductase and ethanol by *Zymomonas mobilis* ATCC 29191 in medium containing corn steep liquor as a source of vitamins. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v.55, p.442-445, 2001.

SIMON, R. *Clavulanic acid extraction process*. US Pat. 6,172,221, 9 jan. 2001. 12p.

SIRINAME, S.R.; PATTERSON, D.G.; MA, L.; JUSTICE, J.B. Application of cloud-point extraction-reversed-phase high performance liquid chromatography: a preliminary study of the extraction and quantification of vitamins A and E in human serum and whole blood. *Journal of Chromatography, B: Biomedical Sciences and Applications*, v.716, n.1/2, p.129-137, 1998.

SIVARS, U.; TJERNELD, F. Mechanisms of phase behavior and protein partitioning in detergent/polymer aqueous two-phase systems for purification of integral membranes proteins. *Biochimica et Biophysica Acta*, v.1474, n.2, p.133-146, 2000.

SMITH, P.K.; KROHN, R.I.; HERMANSON, G.T.; MALLIA, A.K.; GARTNER, F.H.; PROVENZANO, M.D.; FUJIMOTO, E.K.; GOEKE, N.M.; OLSON, B.J.; KLENK, D.C. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry*, v.150, p.76-85, 1985.

STAPLETON, P.D.; SHANNON, K.P.; FRENCH, G.L. Construction and characterization of mutants of the TEM-1 beta-lactamase containing amino acid substitutions associated with both extended-spectrum resistance and resistance to beta-lactamase inhibitors. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v.43, n.8, p.1881-1887, 1999.

SUN, C.; XIE, Y.; TIAN, Q.; LIU, H. Separation of glycyrrhizic and liquiritin from licorice root by aqueous nonionic surfactant mediated extraction. *Colloids and Surfaces*, v.305, p.42-47, 2007.

TANFORD, C. *The hydrophobic effect: formation of micelles and biological membranes*. 2.ed. New York: Wiley, 1980. 233p.

TANI, H.; KAMIDATE, T.; WATANABE, H. Aqueous micellar two-phase systems for protein separation. *Analytical Sciences*, v.14, n.5, p.875-888, 1998.

TOWNSEND, C.A.; HO, M.F. Biosynthesis of clavulanic acid: origin of C5 unit. *Journal of the American Chemical Society*, v.107, p.1065-1066, 1985.

VALENTINE, B.P.; BAILEY, C.R.; DOHERTY, A.; MORRIS, J.; ELSON, S.W.; BAGGALEY, K.H.; NICHOLSON, N.H. Evidence that arginine is a later metabolic intermediate than ornithine in the biosynthesis of clavulanic acid by *Streptomyces clavuligerus*. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, v.15, p.1210-1211, 1993.

VALENTINE, B.P.; JEFFKINS, P.A.; HOLMS, W.H.; MOUSDALE, D.M. *Process for the fermentative preparation of clavam derivatives whereby the levels of ammonia and urea in the fermentation medium kept low*. U.S. Pat. 5,985,624, 16 nov. 1999. 4p.

VIDEIRA, M.; AIRES-BARROS, M.R. Liquid-liquid extraction of clavulanic acid using an aqueous two-phase system of polyethylene glycol and potassium phosphate. *Journal of Chromatography*, v.668, n.1, p.237-240, 1994. [International Conference on Partitioning in Aqueous Two-Phase Systems, 8., Leipzig, 1993].

VORA, S.; GEORGE, A.; DESAI, H.; BAHADUR, P. Mixed micelles of some anionic-anionic, cationic-cationic, and ionic-noionic surfactants in aqueous media. *Journal of Surfactants and Detergents*, v.2, n.2, p.213-221, 1999.

ZAREI, A.R. Cloud point formation based on mixed micelle in the presence of electrolyte for extraction, preconcentration, and spectrophotometric determination of trace amounts of hydrazine in water and biological samples. *Analytical Biochemistry*, v.369, p.161-167, 2007.

ZHANG, G.; MCKNIGHT, J. *Process for the purification of a salt of clavulanic acid*. EP Pat. 1,284,978, 26 fev. 2003.

ZHAO, G.X.; ZHU, B.Y. Surface-adsorption and micellization of the mixed-solution of fluorocarbon and hydrocarbon surfactants. In: SCAMEHORN, J.F., ed. *Phenomena in mixed surfactant systems*. Washington: American Chemical Society, 1986. p.184-198. (ACS Symposium Series, 311) (Developed from a Symposium sponsored by the ACS Division of Colloid and Surface Chemistry at the Colloid and Surface Science Symposium, 59, and the International Conference on Surface and Colloid Science, 5, Postdam, New York, 1985).

ZOURAB, S.M.; SABET, V.M.; ABO-EL DAHAB, H. Behavior of micelles of a nonionic surfactant in the presence of concentrated electrolytes at different temperatures. *Journal of Dispersion Science and Technology*, v.12, n.1, p.25-36, 1991.

ZULAUF, M. Detergent phenomena in membrane protein crystallization. In: MICHEL, H., ed. *Crystallization of membrane proteins*. Boca Raton: CRC Press, 1991. p.53-72.

WALSH, C. *Antibiotics: actions, origins, resistance*. Washington: ASM Press, 2003. p.3, 4, 89, 108, 114.

WANG, Y.; YANG, B.; REN, J.; DONG, M.L.; LIANG, D.; XU, A.L. Optimization of medium composition for the production of clavulanic acid by *Streptomyces clavuligerus*. *Process Biochemistry*, v.40, p.1161-1166, 2005.

WATVE, M.G.; SHEJWAL, V.; SONAWANE, C.; RAHALKAR, M.; MATAPURKAR, M.; SHOUCHE, Y.; PATOLE, M.; PADNIS, N.; CHAMPHENKAR, A.; DAMLE, K.; KARANDIKAR, S.; KRHIRSAGAR, V.; JOG, M. The "K" selected oligophilic bacteria: a key to uncultured diversity? *Current Science*, v.78, p.1535-1542, 2000.

WHITE, D. *The physiology and biochemistry of prokaryotes*. New York: Oxford University Press, 1995. p.187-194.

WILLIAMS, D.A.; LEMKE, T.L. *Foye's principles of medicinal chemistry*. 5.ed. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins, 2002. 1128p.

YAMAZAKI, M.; OHSHIKA, M.; ITO, T. Phase-separation of Triton X-100 micelle solution induced by osmotic-stress. *Biochimica et Biophysica Acta*, v.1063, p.176-177, 1991.

9. APÊNDICE

Apêndice A

Preparo do extrato de farinha de soja

O extrato de farinha de soja foi obtido a partir da pesagem de farinha de soja desengordurada para uma concentração final de 8% m/v. Esta suspensão de farinha foi autoclavada a 121°C por 30 minutos e após esfriar, filtrada com auxílio de bomba de vácuo em papel de filtro de $15 \pm 0,15$ cm de diâmetro. Após a filtração, ajustou-se o pH do filtrado em 6,8 e este foi novamente autoclavado nas mesmas condições anteriores.

Apêndice B

Estabelecimento da Metodologia de Determinação da Concentração de Ácido Clavulânico

Atualmente, na literatura são encontradas duas metodologias principais para a determinação da concentração de ácido clavulânico, o método proposto por Foulstone e Reading (1982), no qual as análises são realizadas em HPLC e o método espectrofotométrico proposto por Bird *et al.*, (1982). Porém, as duas metodologias baseiam-se no mesmo princípio de derivatização do ácido clavulânico com imidazol, gerando um produto estável com absorbância a 312 nm que pode ser relacionado na proporção 1:1 com a concentração do ácido clavulânico presente na amostra. Ortiz (2005) em sua dissertação de mestrado comparou as duas metodologias em amostras obtidas do meio fermentado e observou que não houve diferenças significativas dos resultados obtidos entre ambas.

Uma varredura das soluções contendo os tensoativos utilizados neste trabalho, Triton X-114 e AOT, foi realizada (dados não apresentados) e para o tensoativo não iônico observou-se uma ligeira absorbância a 312 nm, porém, esta é anulada pelo valor de absorbância obtido na solução B (água + amostra), presente na própria metodologia conforme descrito no item 4.3.3. Para evitar a turbidez gerada pelos sistemas ao se trabalhar à temperatura ambiente, as leituras nestas condições foram realizadas em espectrofotômetro com controle de temperatura. Assim, as amostras eram colocadas em banho de gelo e após estar límpida sua leitura era realizada a 15°C, não turvando.

FIGURA A.1. Curva de calibração de absorbância em função da concentração de ácido clavulânico em espectrofotômetro Shimadzu UV-1650PC obtida experimentalmente.

FIGURA A.2. Curva de calibração de absorbância em função da concentração de ácido clavulânico em espectrofotômetro Beckman DU-640 obtida experimentalmente.

Apêndice C

FIGURA A.3. Curva de calibração de absorvância em função da concentração de glicerol obtida experimentalmente.

Anexo – Artigo aceito para publicação

- Stability of clavulanic acid under variable pH, ionic strength and temperature conditions. A new kinetic approach

Stability of clavulanic acid under variable pH, ionic strength and temperature conditions. A new kinetic approach

Valéria Carvalho Santos^a, Jorge F. Brandão Pereira^b, Raquel Brandão Haga^c,
Carlota O. Rangel-Yagui^c, José A. Couto Teixeira^b, Attilio Converti^d,
Adalberto Pessoa Jr.^{a,*}

^a*Department of Biochemical and Pharmaceutical Technology, University of São Paulo,
Avenida Prof. Lineu Prestes 580, Bl. 16, 05508-900 São Paulo, SP, Brazil*

^b*IBB—Institute for Biotechnology and Bioengineering, Center for Biological Engineering,
Universidade do Minho, Campus de Gualtar, 4710-057 Braga, Portugal*

^c*Department of Pharmacy, University of São Paulo, Avenida Prof. Lineu Prestes 580, Bl.
13, 05508-900 São Paulo, SP, Brazil*

^d*Department of Chemical and Process Engineering, University of Genoa, Via Opera Pia
15, 16145 Genoa, Italy*

* Corresponding author. Tel.: Tel.: +55 11 30913862; fax: +55 11 38156386.

E-mail address: pessoajr@usp.br (A. Pessoa Jr).

Abstract

Clavulanic acid (CA) is a β -lactam inhibitor β -lactamases that is used as a therapeutic as a potassium salt in conjunction with amoxicillin. However, it is a well-known fact its instability not only during its production phase, but also during downstream processing. Therefore, the main objective of this study was the evaluation of CA long-term stability under different conditions of pH and temperature, in the presence of variable levels of different salts, so as to suggest the best conditions to perform its simultaneous production and recovery by two-phase polymer/salt liquid-liquid extractive fermentation. To this purpose, the CA stability was investigated at different values of pH (4.0-8.0) and temperature (20-45°C), and the best conditions were met at a pH 6.0-7.2 and 20°C. Its stability was also investigated at 30°C in the presence of NaCl, Na₂SO₄, CaCl₂ and MgSO₄ at concentrations of 0.1 and 0.5 M in Mcllvaine buffer (pH 6.5). All salts led to increased CA instability with respect to the buffer alone, and this effect decreased in following sequence: Na₂SO₄ > MgSO₄ > CaCl₂ > NaCl. Kinetic and thermodynamic parameters of CA degradation were calculated adopting a new model that took into consideration the equilibrium between the active and a reversibly-inactivated forms of CA after long-time degradation.

Keywords: Clavulanic acid; Stability; pH; Temperature; Salts; Ionic Strength; Degradation kinetics; Reversible inactivation; Thermodynamics

1. Introduction

Antibiotics represent the industrially most important group of secondary metabolites. They are encompassing a broad group of chemical compounds with a wide range of different molecular targets in fighting infectious diseases [1]. The β -lactam family is the biggest and most important class of clinical antibiotics [2]. Their sales are estimated at US\$15 billion, so they represent the major biotechnology products with worldwide dosage sales at around 65% of the total market of antibiotics [3]. β -Lactams act by inhibiting bacterial cell wall peptidoglycan biosynthesis. They have a common four-membered β -lactam ring attached to different structures [2].

Currently, bacteria have shown resistance to β -lactam antibiotics by producing β -lactamases, which degrade and make them inactive. Despite this problem, these antibiotics are still important and effective in antimicrobial therapy in many situations, leading the pharmaceutical industry to develop strategies to contain the expansion of β -lactamases. One of the strategies to circumvent this problem is the use of inhibitors of β -lactamases that are structurally similar to β -lactam antibiotics such as the clavulanic acid (CA) [4].

CA is a bicyclic β -lactam (condensed β -lactam and oxazolidine rings) that does not possess either the penicillin or the cephalosporin nucleus. It is a metabolite found in cultures of *Streptomyces clavuligerus* and was isolated during the early 1970s through a program of natural product screening designed to discover potential inhibitors of β -lactamases [5,6]. It has a powerful inhibitory activity against β -lactamases from a variety of Gram-positive and Gram-negative bacteria [7]. Potassium clavulanate is often used in

conjunction with amoxycillin and prescribed clinically as co-amoxiclav (Augmentin^(TM)) or with ticarcillin as Timentin^(TM) [8].

Like other β -lactam compounds, CA in its crude form is chemically unstable, due to susceptibility of the carbonyl group linked to the β -lactam ring to suffer an acidic (H^+)- or alkaline (OH^-)-catalyzed attack by water molecules [9-10]. Thus, in addition to the use of CA in the pharmaceutical industry, studies covering its stability in a wide range of pH, temperature, types and concentrations of salts are of particular concern. Several research-groups have conducted studies on the stability of CA from various sources in aqueous solutions under different conditions [7,11-14]. To make only a few examples, Haginaka et al. [7], who investigated in different buffers the stability of CA at 35°C and ionic strength of 0.5, observed, in the pH range 3.1-10.1, that the rate of its degradation followed pseudo-first-order kinetics, was strongly pH-dependent and increased with buffer concentration. Moreover, since the highest CA stability was obtained at 6.39, they concluded that either acidic or alkaline catalysis modulated by the buffering salts played a significant role in the hydrolysis.

Bersanetti et al. [14], investigating the stability of CA from several sources in the temperature range 10-45°C at pH 6.2 and 7.0, observed that CA from fermentation was less stable than the commercial one employed for medical use and that its degradation followed first-order kinetics. So, they used the Arrhenius equation to relate the rate constant of CA degradation to temperature and to estimate its activation energy. Nevertheless, it is evident in the above studies that, under some conditions, this kinetics diverged from the classical first-order model, suggesting us that a preliminary equilibrium may precede the irreversible degradation.

This study aimed at evaluating the stability of CA at different pH, temperature and salts conditions along the time. The kinetic and thermodynamic parameters of its degradation were then calculated adopting a new model that takes into consideration the equilibrium between the active form and a reversibly-inactivated form of CA after long-time degradation.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Potassium salt of clavulanic acid (CA) of pharmaceutical grade (54% purity) obtained from Galena (Campinas, São Paulo, Brazil) was used in the stability tests, while the one used to prepare standard solutions was purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) (99% purity). All the other reagents were of analytical grade and used as received. The solutions for the CA stability tests were prepared in McIlvaine buffer by adding disodium phosphate and citric acid at different molar concentrations depending on pH. In particular, the concentrations of disodium phosphate were 3.08, 5.05, 5.30, 17.4 and 7.78 mM and those of citric acid 2.46, 1.47, 1.38, 1.82 and 0.11 mM at pH 4.0, 6.0, 6.5, 7.2 and 8.0, respectively. Deionized water, obtained passing tap water through a Millipore Milli-Q ion-exchange system (Bedford, MA, USA), was always used.

2.2. Experimental procedure

All stability tests were performed in solutions containing an initial CA concentration of 30 mg/L. They were prepared by diluting a concentrated stock solution (300 mg/L) with McIlvaine buffer with the selected pH. The solutions were then homogenized in orbital shaker, model 400110 (Branstead/Thermolyne, Dubuque, IA, USA), at 8 rpm for 5 min at room temperature and kept in a bath, model 521/2DE (New Ethics, Vargem Grande Paulista, SP, Brazil), at the desired temperature. Aliquots of the solutions were withdrawn at different times, and the concentration of undegraded CA was determined as described later. All experiments were performed in triplicate, and the standard deviations and confidence intervals calculated. The limit of significance for the statistical analysis was resulting in a confidence interval of 95%.

A first set of experiments was performed where the CA stability was determined at pH 4.0, 6.0, 6.5, 7.2 and 8.0 and temperatures of 20, 25, 30 and 45°C.

In a second set of experiments that lasted 6 h, the CA stability was determined at pH 6.5 and 30°C but varying the ionic strength (μ) by addition of different salts, specifically NaCl, CaCl₂, MgSO₄ and Na₂SO₄, at concentrations of 0.1 or 0.5 M. To relate the CA degradation to the ionic strength, such a parameter was calculated by the equation [15]:

$$\mu = 0.5 \times (C_1 Z_1^2 + C_2 Z_2^2 + \dots + C_n Z_n^2) = 0.5 \times \sum_{i=1}^{i=n} C_i \times Z_i^2 \quad (1)$$

where C_i is the molar concentration of each ion, Z_i is its charge number, and the sum is taken over all ions in the solution. Thus, the ionic strength of a solution is a function of all ions present.

The final part of the study was devoted to the determination of CA degradation kinetics at different temperatures (15, 20, 30 and 45°C) for 24 h as well as to the estimation of the related thermodynamic parameters making use of simple Arrhenius-type model.

2.3. Analytical methods

According to Bird et al. [16], the CA concentration was determined by measuring the increase in the optical density at 312 nm due to the release of the product [1-(8-hydroxy-6-oxo-4-azooct-2-enol)-imidazole] of the reaction between CA and imidazole. The optical density was determined using a spectrophotometer, model UV-1650PC (Shimadzu, Kyoto, Japan). Standard solutions with different concentrations were used to get a calibration curve able to relate the optical density with the concentration.

3. Results and discussion

3.1. Study of CA stability at different temperatures and pHs

The stability of clavulanic acid (CA) in McIlvaine buffer at $4.0 \leq \text{pH} \leq 8.0$ and temperature ranging from 20 to 45°C was determined after 3 and 6 h, and the related results are presented in Figs. 1 and 2, respectively. In order to make comparison of results possible, the above range of pH was selected on the basis of those reported in the literature as the most adequate for CA stability [7,14]. On the other hand, the range of temperature

was selected, besides following this criterion, also taking into account previous finding [17,18] as well as the intention of utilizing these results in future CA extraction by aqueous two-phase systems with temperature-dependent binodal curves.

Fig. 1. Stability of CA in McIlvaine buffer at different values of temperature and pH after 3 h. pH: 4.0 (■), 6.0 (■), 6.5 (■), 7.2 (■), 8.0 (□).

Fig. 2. Stability of CA in McIlvaine buffer at different values of temperature and pH after 6 h. pH: 4.0 (■), 6.0 (■), 6.5 (■), 7.2 (■), 8.0 (□).

As expected, the longer the exposition time, the greater the stability loss under all conditions tested. Moreover, this loss of stability was more pronounced at extreme pHs (4 and 8) and the highest temperatures (30 and 45°C). Although both these parameters exerted a significant influence on CA stability, the former showed a greater effect than the latter; significant stability variations were in fact already observed at different temperatures only at pH values quite different from the optimum stability pH reported for this drug (6.39) [7]. In particular, after 3-6 h at $6.0 \leq \text{pH} \leq 7.2$ no more than 5-10% of CA was degraded in the present study even at the highest temperature (45°C), whereas, either under more acidic (4.0) or more alkaline (8.0) conditions, these loss percentages increased at 45°C up to 60-83% and 40-67%, respectively.

The observed CA instability could have been the result either of acid- or alkali-catalyzed degradation. Taking into consideration that the alkaline conditions tested in this study (pH 8.0) are closer to the optimum stability range found in this study (pH 6.0-7.2) than the acidic ones (pH 4.0), it appears reasonable to conclude that the alkali-catalyzed degradation of CA was faster and stronger than the acidic one. These results are in good agreement with the literature. Haginaka et al. [7], studying the stability of CA in aqueous solution at 35°C, ionic strength of 0.5 M in the pH range of 3.1-10.1, found that the rate of its degradation is highly pH-dependent and reached a minimum value at pH 6.39. This value is within the pH range of stability found in this study. Moreover, our results agree with those of Bersanetti et al. [14], who investigated the rate of degradation of this drug from various sources in the temperature range 10-40°C and demonstrated that at the lowest temperature CA was more stable at pH 6.2 than 7.0, irrespective of its source.

The stronger influence of pH with respect to temperature evidenced in this work on CA stability may be due to the presence in its structure of the carbonyl group of the β -lactam ring, which is susceptible to attack by protons or hydroxide ions and water molecules, according to the conditions [9].

These results as a whole demonstrate that the best conditions for CA stability are in the pH range of 6.0-7.2. Therefore, in view of future adoption of two-aqueous phase extractive fermentation system, the subsequent investigation on the effects of different salts and concentrations has been performed just under these conditions.

3.2. Stability of clavulanic acid in different types of salts and concentrations

The second step of this study dealt with the effects of different salts and concentrations on the CA stability at an intermediate value (6.5) of the above optimum pH range. To this purpose, in order to take into consideration the highest variations as possible, the highest temperature (30°C) of the optimum range previously selected (20-30°C) was chosen for comparison. The salts utilized in this part of the study (NaCl, Na₂SO₄, CaCl₂ and MgSO₄) were selected so as to investigate a large range of ionic strength (0.02-3.02 M) [19] as well as to follow literature suggestions on polymeric [20] and micellar [21] aqueous two-phase systems. The maximum salt concentration investigated in this study (0.5 M) was selected on the basis of previous literature findings on the degradation of different β -lactam compounds [7,22,23]. On the other hand, the lowest concentration (0.1 M) was chosen taking into account that the partition systems to be used in future work only need a low concentration of salts [24].

Fig. 3 illustrates the results of these tests after 6 h using the above salts at concentrations of 0.1 and 0.5 M, which are compared with those obtained in the McIlvaine buffer alone. These results clearly show that the supplementation of different salts either at high (0.5 M) or low (0.1 M) salt level affected the stability of CA in the McIlvaine buffer. In particular, all salts led to an increased CA degradability with respect to the buffer alone (by about 4%), and this effect decreased in following sequence: Na₂SO₄ > MgSO₄ > CaCl₂ > NaCl. The error bars with 95% confidence interval suggest that the losses induced by an increase in the concentrations of the first two salts in McIlvaine buffer are practically the same. Thus, it seemed that the degradability of CA could be a function of the ionic strength.

Fig. 3. Stability at 30°C of CA in McIlvaine buffer (pH 6.5) supplemented with different salts at concentrations of 0.1 and 0.5 M after 6 h. Salt: None (■), NaCl (■), CaCl₂ (■), MgSO₄ (■), Na₂SO₄ (□).

This hypothesis is confirmed in Fig. 4, where the stability of CA is plotted versus the ionic strength for all the salts tested at the two selected levels. Although the percentage of undegraded CA always kept higher than 90% after 6 h, it is evident that this parameter linearly decreased with increasing the ionic strength and was strongly influenced by the kind of salt. But the most interesting finding is that two different straight lines were obtained at the two concentrations under investigation. In particular, the straight line obtained at the lower salt level ($r^2 = 0.929$) is characterized by a slope about 5-fold that referring to the higher one ($r^2 = 0.959$).

Fig. 4. Influence of the ionic strength on the stability at 30°C of CA in McIlvaine buffer (pH 6.5) supplemented with different salts at concentrations of 0.1 M (●) and 0.5 M (□) after 6 h.

The above results suggest that the CA stability was not a simple linear function of the ionic strength, but, for a given value of this parameter, it is also influenced by other factors. For all the salts, the loss of CA stability consequent to the rise in concentration from 0.1 to 0.5 M was significant but not so large; the fraction of degraded CA did in fact only increase from about 4 to 5% with NaCl, from 5 to 7% with CaCl₂, from 7 to 8% with MgSO₄ and from 8 to 9% with Na₂SO₄, respectively. This result partially agrees with those of Laidler [19], who stressed that the ionic strength, for a given salt, has no relevant influence on the rate of hydrolysis reactions.

No comparison with literature data is possible because, as earlier mentioned, most of the work in this field was done keeping constant the ionic strength at a value of 0.5 M [7,22,23]. Nevertheless, an indirect comparison can be made with the results reported by Haginaka et al. [7], who observed a rate of degradation increasing with the concentration of different buffers, for a given value of the ionic strength of the medium (0.5 M).

3.3. Kinetics of clavulanic acid degradation at different temperatures

The final part of the study has been devoted to the kinetics of CA degradation at the best conditions previously determined (pH 6.5 and 0.1 M NaCl) but varying temperature between 15 and 45°C.

To this purpose, a pseudo-first order model was previously proposed and successfully employed to describe the degradation of CA [7] and other β -lactam compounds [22] versus time. However, the results of Fig. 5, taken as an example, show that this model is able to effectively describe the kinetics of the system only at the beginning of the exposition at the selected temperature (45°C), whereas a deceleration of the degradation took place in a second phase. Similar trends were also observed at the other temperatures.

Fig. 5. Semi-log plot of the ratio of the residual to the initial CA concentrations (C_a/C_a°) versus time. Tests performed in McIlvaine buffer at pH 6.5, 45°C and 0.1 M NaCl.

This behavior, which can be recognized also under some of the conditions utilized in the work of Bersanetti et al. [14], is typical of equilibrium reactions or simultaneous opposite reactions [25] rather than of first-order irreversible reaction. Therefore, the kinetic approach proposed by the above authors has been implemented, under the conditions selected for this work, hypothesizing the preliminary occurrence of an equilibrium between the stable CA configuration (C_a) and a configuration more sensitive to degradation (C_a^*), as the likely result of the acid- or alkali-catalyzed complexation of CA, followed by a first-order reaction leading to the formation of the products of CA degradation (C_d). To this respect, it was demonstrated that different degradation products are obtained under acidic

or alkaline conditions [7], but this is not relevant for the kinetic purposes of this study. The proposed phenomenological situation can be described by the reaction sequence:

where K is the constant of the complexation-decomplexation equilibrium and k_d the pseudo-first-order constant of the irreversible degradation reaction.

At the start of the exposition at a given temperature, when the C_a^* concentration is almost negligible, the former equilibrium can be regarded as totally shifted towards C_a^* formation; therefore, the traditional first-order model approach can be applied successfully, because the degradation of C_a^* to C_d becomes the limiting stage. So, the slopes of the straight lines as that depicted in Fig. 5 up to 6 h give the values of k_d for each temperature, which are listed in Table 1. The value of k_d observed in this study at 30°C is only 9% higher than that previously reported at the same temperature and pH 6.2 [14].

Table 1. Values of the constants of CA complexation-decomplexation equilibrium (K) and of the pseudo-first-order constants of the irreversible CA degradation (k_d) estimated at different temperatures

Temperature (°C)	15	20	30	45
K (—)	0.0248	0.0434	0.0636	0.1284
k_d (h ⁻¹)	0.0046	0.0068	0.0079	0.0119

On the other hand, after this time, the concentration of C_a^* cannot be neglected anymore, and the preliminary equilibrium reaches a condition where C_a^* is shifted to C_a formation; therefore, it becomes the limiting step of the degradation, and the first-order reaction can be neglected. According to this last hypothesis, the results of Fig. 5 after $t > 6$ h, only depend on the equilibrium and can be used to estimate its kinetic and thermodynamic parameters.

After the achievement of the equilibrium we can write:

$$K = \frac{C_a^*}{C_a} \quad (3)$$

where:

$$C_a^* = C_a^o - C_a \quad (4)$$

being C_a^o the concentration of C_a at the start of each run.

Therefore:

$$\frac{C_a}{C_a^o} = \frac{1}{(K+1)} \quad (5)$$

The slopes of the straight lines as that in Fig. 5 for $t > 6$ h allowed estimating the values of K listed in Table 1 for the different temperatures selected for this study. It is noteworthy that the values of both parameters increased with temperature, which suggested Arrhenius-type behaviors.

Plotting these data in semi-log plots versus the reciprocal absolute temperature, the straight lines illustrated in Fig. 6 were obtained, which describe typical Arrhenius behaviors with good correlation in both cases ($r^2 = 0.972$ for K and 0.939 for k_d , respectively). The slopes of these straight lines allowed estimating both the activation energy of the irreversible CA degradation ($E_a = 22.0$ kJ/mol) and the standard free energy variation of the preliminary complexation-decomplexation equilibrium ($\Delta G^\circ = 39.3$ kJ/mol). Whereas the latter values cannot be compared with literature because of the new approach proposed in this study, the former one is close to the activation energy reported at pH 6.2 for CA obtained by fermentation (24.0 kJ/mol), but lower than that obtained with commercial CA (46.1 kJ/mol) [14]. The higher values of activation energy previously reported (61.5-79.5 kJ/mol) [7] should be associated to the much quicker degradation obtained under different pH conditions because of a higher temperature range (35-65°).

Fig. 6. Semi-log plots of the constant of CA complexation-decomplexation equilibrium (K) and of the pseudo-first-order constant of the irreversible CA degradation (k_d) versus the reciprocal absolute temperature. Tests performed in McIlvaine buffer at pH 6.5 and 0.1 M NaCl.

Conclusions

In view of future development of a two-phase polymer/salt liquid-liquid extractive fermentation for simultaneous clavulanic acid production and recovery, the long-term stability of this inhibitor of β -lactamases has been investigated under different conditions of pH and temperature, in the presence of variable levels of different salts. The longer the exposition time, the greater its instability under all the conditions tested, especially at extreme values of pH and high temperatures. The effect of pH was stronger than that of

temperature, especially under alkaline conditions. The degradation of CA appeared to be also a function of the ionic strength, since it increased in the presence of all tested salts compared to the buffer alone, and this effect decreased in the following sequence: $\text{Na}_2\text{SO}_4 > \text{MgSO}_4 > \text{CaCl}_2 > \text{NaCl}$.

Finally, a new kinetic model has been proposed for CA degradation, which hypothesizes equilibrium between the active form and a reversibly-inactivated form of CA and subsequent first-order irreversible degradation. The resulting kinetic results have been utilized to estimate the thermodynamic parameters of both hypothesized phenomena.

Acknowledgements

It is gratefully acknowledged the financial support of FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, São Paulo, Brazil) in the form of scholarships to V.C. Santos and R.H. Brandão, and of CNPq (National Council for Scientific and Technological Development, Brasília, Brazil) and CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior).

References

- [1] J.S. Rokem, A.E. Lantz, J. Nielsen, Systems biology of antibiotic production by microorganisms, *Nat. Prod. Rep.* 24 (2007) 1262-1287.
- [2] S.J. Coulthurst, A.M.L. Barnard, G.P.C. Salmond, Regulation and Biosynthesis of carbapenem antibiotics in bacteria, *Nat. Rev. Microbiol.* 3 (2005) 295-306.
- [3] R.P. Elander, Industrial production of β -lactam antibiotics, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 61 (2003) 385-392.
- [4] K.H. Baggaley, A.G. Brown, C.J. Schofield, Chemistry and biosynthesis of clavulanic acid and others clavams, *Nat. Prod. Rep.* 14 (1997) 309-333.
- [5] R. Nagarajan, L.D. Boeck, M. Gorman, R.L. Hamill, C.E. Higgins, M.M. Hoehn, Beta-lactam antibiotics from *Streptomyces*, *J. Am. Chem. Soc.* 93 (1971) 2308-2310.
- [6] J. Finlay, L. Miller, J.A. Poupard, A review of the antimicrobial activity of clavulanate, *J. Antimicrob. Chemother.* 52 (2003) 18-23.
- [7] J. Haginaka, T. Nakagawa, T. Uno, Stability of clavulanic acid in aqueous solutions, *Chem. Pharm. Bull.* 29 (1981) 3334-3341.
- [8] M.G. Watve, V. Shejval, C. Sonawane, M. Matapurkar, Y. Shouche, M. Patole, N. Padnis, A. Champhenkar, K. Damle, S. Karandikar, V. Krhirsagar, M. Jog, The “K” selected oligophilic bacteria: a key to uncultured diversity? *Curr. Sci.* 78 (2000) 1535-1542.
- [9] J. Konecny, E. Felber, J. Gruner, Kinetics of the hydrolysis of cephalosporin C, *J. Antibiot. (Tokyo)* 26(3) (1973) 135-141.

- [10] P.S. Saudagar, S.A. Survase, R.S. Singhal, Clavulanic acid: A review, *Biotechnol. Adv.* 26 (2008) 335-351.
- [11] A.F. Mayer, W.D. Deckwer, Simultaneous production and decomposition of clavulanic acid during *Streptomyces clavuligerus* cultivations, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 20 (1996) 41-46.
- [12] J.A. Roubous, P. Krabben, W.T.A.M. De-Laat, R. Babuska, J.J. Heijnen, Clavulanic acid degradation in *Streptomyces clavuligerus* fed-batch cultivations, *Biotechnol. Progr.* 18 (2002) 451-457.
- [13] H.C. Lynch, Y. Yang, Degradation products of clavulanic acid promote clavulanic acid production in cultures of *Streptomyces clavuligerus*, *Enzyme Microb. Technol.* 34 (2004) 48-54.
- [14] P.A. Bersanetti, R.M.R.G. Almeida, M. Barboza, M.L.G.C. Araujo, C.O. Hokka, Kinetic studies on clavulanic acid degradation, *Biochem. Eng. J.* 23 (2005) 31-36.
- [15] K.S. Pitzer, Electrolyte solutions: introduction and simple examples, in: *Thermodynamics*, McGraw-Hill, New York, 1995, pp. 254-274.
- [16] E. Bird, J.M. Bellis, B.C. Gasson, Spectrophotometric assay of clavulanic acid by reaction with imidazole, *Analyst* 107 (1982) 1241-1245.
- [17] J.F.B. Pereira, V.C. Santos, H.-O. Johansson, J.A.C. Teixeira, A. Pessoa Jr., Application of the polymeric two aqueous phase system made of poly(ethylene glycol) (PEG) and sodium poly(acrylate) (NaPA) in the presence of NaCl for clavulanic acid extraction (in Portuguese), *Rev. Bras. Cienc. Farm.* 44 (2008) 22.

- [18] V.C. Santos, R.B. Haga, C.O. Rangel-Yagui, A. Pessoa Jr., Extraction of clavulanic acid by mixed two aqueous phase micellar systems: Effect of surfactant agents and process time (in Portuguese), *Rev. Bras. Cienc. Farm.* 44 (2008) 7.
- [19] K.J. Laidler (Ed.), *Chemical Kinetics*, Mc Graw Hill, New York, 1950, pp. 282-294.
- [20] H.O. Johansson, F.M. Magaldi, E. Feitosa, A. Pessoa Jr., Protein partitioning in poly(ethylene glycol) sodium polyacrylate aqueous two-phase systems, *J. Chromatogr. A* 1178 (2008) 145-153.
- [21] M. Jan, A.A. Dar, A. Amin, N. Rehman, G.M. Rather, Clouding behavior of nonionic-cationic and nonionic-anionic mixed surfactants systems in presence of carboxylic acids and their sodium salts, *Colloid Polym. Sci.* 285 (2007) 631-640.
- [22] R. Méndez, T. Alemany, J. Martín-Villacorta, Stability in aqueous solution of two monocyclic β -lactam antibiotics: aztreonam and nocardicin A, *Chem. Pharm. Bull.* 40 (1992) 3222-3227.
- [23] P.A. Bersanetti, M. Barboza, C.O. Hokka, M.L.G.C. Araujo, Estudos cinéticos de hidrólise do ácido clavulânico, in: *Proceedings of the 13th XIII National Symposium on Fermentations*, vol. 6, Teresópolis, Brazil, 2000, pp. 1-39.
- [24] H.O. Johansson, M. Ishii, M. Minaguti, E. Feitosa, T.C.V. Penna, A. Pessoa Jr., Separation and partitioning of Green Fluorescent Protein from *Escherichia coli* homogenate in poly(ethylene glycol)/sodium-poly (acrylate) aqueous two-phase systems, *Sep. Purif. Technol.* 62 (2008) 166-174.
- [25] J.E. Bailey, D.F. Ollis, *Biochemical engineering fundamentals*, 2nd edition, Mc Graw-Hill, New York, 1986.