UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos
Área de Insumos Farmacêuticos

Estudo da partição de ácido clavulânico empregando sistemas
micelares de duas fases aquosas com adição de sal ou
polímero

Marcela de Siqueira Cardoso Silva

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientadora:
Prof^a. Dr^a. Carlota de Oliveira Rangel
Yagui

São Paulo
2012

MARCELA DE SIQUEIRA CARDOSO SILVA

Estudo da partição de ácido clavulânico empregando sistemas micelares
de duas fases aquosas com adição de sal ou polímero

Dissertação apresentada à Faculdade de
Ciências Farmacêuticas da Universidade
de São Paulo para a obtenção do título de
Mestre em Fármaco e Medicamentos.

Área de concentração: Insumos
Farmacêuticos

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Carlota de Oliveira
Rangel Yagui

São Paulo
2012

MARCELA DE SIQUEIRA CARDOSO SILVA

Estudo da partição de ácido clavulânico empregando sistemas micelares de duas fases aquosas com adição de sal ou polímero

Comissão julgadora da
dissertação para a obtenção do grau de Mestre

Prof^a. Dr^a. Carlota de Oliveira Rangel Yagui
Orientadora/ Presidente

1^o. Examinador/ Dr^a. Priscila Gava Mazzola

2^o. Examinador/ Dr^a. Daniela de Borba Gurpilhares

São Paulo, 20 de setembro de 2012.

Aos meus pais, Vanda e Ademar... Com muita gratidão, carinho e amor.

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (FCF/USP), pela oportunidade e infraestrutura para a realização deste trabalho.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo financiamento do estudo e pela bolsa de mestrado concedida.

Aos meus pais, Ademar e Vanda, e à minha irmã, Mariana, pelo apoio, dedicação e amor ao longo da vida.

À minha orientadora, Prof.^a Dr.^a Carlota de Oliveira Rangel Yagui, pela oportunidade, confiança, incentivo e paciência.

Ao Prof.^o Dr.^o Adalberto Pessoa Junior e seus alunos, pela disponibilização do seu laboratório e de alguns reagentes para a realização dos experimentos, em especial, ao André Moreni Lopes e à Valéria Carvalho, pela imensa ajuda e por transmitirem todo seu conhecimento, com toda a atenção e dedicação.

À amiga Camila Ayami Yamamoto Tanabe, pela amizade de todos esses anos, pelo ótimo período de convivência no laboratório e por todos os momentos de descontração. Neste mesmo pensamento, agradeço à amiga Ellen Shergue, ao Prof.^o Diogo Seibert Lüdke e seus alunos Ana Dionéia Wouters, Hugo Braga e Adrieli Bessa.

Aos amigos e colegas de laboratório, pelo convívio e pelos momentos descontraídos, como os bate-papos e almoços. Em especial ao Charles de Lima Brito, pelas inúmeras conversas em frente à bancada e pela ajuda técnica dentro do laboratório e à aluna Nathália Barros Militão dos Santos, uma querida amiga e iniciação científica, que me transmitiu muito conhecimento, principalmente pelo seu jeito sereno de ser e de enfrentar os diversos problemas que surgem ao longo de toda caminhada.

Aos professores do grupo de pesquisa Dr.^o Gustavo Trossini, Dr.^o Roberto Parise, Dr.^a Veni Felli e Dr.^a Elizabeth Igne Ferreira.

À toda a minha família, que sempre esteve presente, pelo incentivo e pelo apoio incondicional. Em especial à minha tia e madrinha, Fátima Cardoso, pela qual tenho um imenso carinho e amor, força e fé nesta caminhada.

Ao meu namorado Tiago Guaranha, pelo apoio, amor e cumplicidade.

Às *hommies* que moraram e moram comigo, Marselle Barbo, Taíse Mendes e Simone Vieira, o meu muitíssimo obrigada pelo apoio e principalmente pelas inúmeras conversas após um dia exaustivo de trabalho e pelas saídas animadas, viva Aurora!

Às vizinhas Natalinha, Sofia e Roberta, meu agradecimento recheado de carinho e alegria. Foi muito bom conviver com vocês e com as *hommies*... vou levar na memória todos os momentos, em especial, nossa ceia natalina de 2011 e nosso dia dos namorados de 2012, verdadeiramente como uma grande família.

À todos que não foram citados, mas que de alguma forma participaram e colaboraram com o desenvolvimento deste trabalho.

“Temos o destino que merecemos. O nosso destino está de acordo com os nossos méritos.”

Albert Einstein

RESUMO

SILVA, M. S. C. **Estudo da partição de ácido clavulânico empregando sistemas micelares de duas fases aquosas com adição de sal ou polímero**. 2012. 125 f. Dissertação (Mestrado em Fármaco e Medicamentos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

O ácido clavulânico (AC) é um potente inibidor de β -lactamases, sendo utilizado em associação com antibióticos β -lactâmicos. Atualmente, a purificação industrial do AC envolve, principalmente, processos de extração líquido-líquido com solventes orgânicos e etapas cromatográficas. Assim, métodos alternativos como os sistemas micelares de duas fases aquosas (SMDFA), os quais oferecem seletividade na partição de biomoléculas de acordo com sua hidrofobicidade, são de grande interesse. O presente trabalho teve como objetivo estudar a partição do AC em sistemas micelares não iônicos de duas fases aquosas, puros e com adição do sal $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ou do polímero sulfato de dextrana (Dx-S). Os estudos de estabilidade do AC mostraram que o fármaco é mais estável em pH 6,5 e temperaturas mais baixas (5 – 20 °C). Em relação à presença dos aditivos, foi verificado que a adição do Dx-S acarretou em menor perda da estabilidade do AC quando comparado ao $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, com valor residual $\geq 90\%$ a 35 °C. Na presença dos tensoativos Triton X-114 e Triton X-100, o AC apresentou-se estável, com valor residual de aproximadamente 100%. De acordo com os ensaios de partição, o AC foi recuperado preferencialmente na fase pobre em micelas, tanto nos sistemas TX/tampão quanto TX/sal para ambos os tensoativos, com valores de coeficiente de partição (K_{AC}) $\sim 0,7$ e rendimento na fase diluída (Y_{clavd}) $\sim 75\%$. A adição do polímero em maiores concentrações ($\geq 8\%$ p/p) proporcionou um pequeno aumento nos valores de K_{AC} , porém com valores ainda próximos a 1 - 1,5. Portanto, os resultados demonstraram que a presença dos aditivos não influenciou suficientemente a partição do AC para a fase micelar e, desta maneira, os sistemas TX/tampão mostraram ser mais eficientes para a recuperação do ácido clavulânico na fase pobre em micelas, podendo ser empregados como etapa prévia de extração em um processo biotecnológico.

Palavras-chave: ácido clavulânico, micelas, extração líquido-líquido, sistema de duas fases aquosas.

ABSTRACT

SILVA, M. S. C. **Study of clavulanic acid partitioning using two-phase aqueous micellar system with salt or polymer addition.** 2012. 125 f. (Master's Dissertation)
- Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

Clavulanic acid (CA) corresponds to a potent β -lactamase inhibitor that is used in association with β -lactamic antibiotics. The industrial purification of CA usually involves liquid-liquid extraction processes employing organic solvents followed by several chromatographic steps. Therefore, new purification alternatives such as aqueous two-phase micellar systems (ATPS) are of great interest. These systems can provide selectivity in biomolecule partitioning according to hydrophobicity and other molecular properties. Within this context, the main goal of this study was to investigate CA partitioning in aqueous two-phase micellar (nonionic) systems, with and without the addition of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ or dextrane sulfate (Dx-S). Stability studies performed with CA indicated that the drug is more stable at pH 6.5 and lower temperatures (5 – 20 °C). In addition, it was demonstrated that Dx-S addition led to a lower loss of CA stability in comparison to $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, with residual values $\geq 90\%$ at 35 °C. The drug was found to be very stable in the presence of the surfactants Triton X-114 and Triton X-100, with residual values around 100%. Regarding CA partitioning in the ATPMS, the drug partitioned preferentially to the micelle-poor phase, irrespective of the surfactante employed and of the presence of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, with partition coefficient (K_{AC}) ~ 0.7 and yield in the poor phase (Y_{clavd}) $\sim 75\%$. Nonetheless, the addition of Dx-S in concentrations ($\geq 8.0\%$ p/p) resulted in a discrete increase in K_{AC} , with values around 1 – 1.5. Therefore, the results obtained in this work demonstrated that the addition of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ or Dx-S to ATPMS did not significantly influenced CA partitioning to the micelle-rich phase and, in this context, the systems investigated could be considered more eficiente for CA recovery in the micelle-poor phase, as a previous extraction step of a biotechnological process.

Keywords: Clavulanic acid, micelles, liquid-liquid extraction, aqueous two-phase systems.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Porcentagem de vendas de antibióticos por classe no ano de 2009.....	23
Figura 2. Esquema das ligações cruzadas para a construção da parede celular bacteriana	24
Figura 3. Mecanismo de ação normal e mecanismo inibido pela molécula de penicilina	25
Figura 4. Estrutura química do ácido clavulânico	28
Figura 5. Mecanismo de ação do ácido clavulânico, por inibição irreversível da enzima β -lactamase.	29
Figura 6. Via biossintética da produção de ácido clavulânico em <i>S. clavuligerus</i> ..	31
Figura 7. Estrutura química dos tensoativos não iônicos, derivados dos alquilfenóis etoxilados (Triton X-114 e Triton X-100). Representação micelar da porção hidrofílica destes tensoativos	41
Figura 8. Ilustração esquemática do equilíbrio termodinâmico reversível monômero - micela.....	42
Figura 9. Representação esquemática de um sistema micelar de duas fases aquosa para um tensoativo não iônico alquilfenol etoxilado.	43
Figura 10. Representação da curva binodal para um sistema formado por tensoativo não iônico alquilfenol etoxilado/tampão.	44
Figura 11. Classificação dos íons em relação à interação com a molécula de água	45
Figura 12. Estrutura química do polímero sulfato de dextrana (Dx-S).....	53
Figura 13. Reação do ácido clavulânico com imidazol	54
Figura 14. Esquema do procedimento experimental para SMDFA.....	57
Figura 15. Concentração de ácido clavulânico em tampão McIlvaine pH 2,0 a 5, 20 e 35 °C ao longo de 24 horas. As barras de erro correspondem a um intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos	61
Figura 16. Concentração de ácido clavulânico em tampão McIlvaine pH 4,0 a 5, 20 e 35 °C ao longo de 24 horas. As barras de erro correspondem a um intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos	61
Figura 17. Concentração de ácido clavulânico em tampão McIlvaine pH 6,5 a 5, 20 e 35 °C ao longo de 24 horas. As barras de erro correspondem a um intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos	62

Figura 18. Concentração de ácido clavulânico em tampão Mcllvaine pH 6,5 frente à diferentes concentrações de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a 5 °C ao longo de 24 horas. As barras de erro correspondem a um intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos	64
Figura 19. Concentração de ácido clavulânico em tampão Mcllvaine pH 6,5 frente à diferentes concentrações de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a 20 °C ao longo de 24 horas. As barras de erro correspondem a um intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos	64
Figura 20. Concentração de ácido clavulânico em tampão Mcllvaine pH 6,5 frente à diferentes concentrações de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a 35 °C ao longo de 24 horas. As barras de erro correspondem a um intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos	65
Figura 21. Concentração de ácido clavulânico em tampão Mcllvaine pH 6,5 frente à diferentes concentrações de sulfato de dextrana (Dx-S) a 5 °C ao longo de 24 horas. As barras de erro correspondem a um intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos	67
Figura 22. Concentração de ácido clavulânico em tampão Mcllvaine pH 6,5 frente à diferentes concentrações de sulfato de dextrana (Dx-S) a 20 °C ao longo de 24 horas. As barras de erro correspondem a um intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos	67
Figura 23. Concentração de ácido clavulânico em tampão Mcllvaine pH 6,5 frente à diferentes concentrações de sulfato de dextrana (Dx-S) a 35 °C ao longo de 24 horas. As barras de erro correspondem a um intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos	68
Figura 24. Concentração de ácido clavulânico em tampão Mcllvaine pH 6,5 frente à diferentes concentrações de Triton X-114 a 20 °C ao longo de 24 horas. As barras de erro correspondem a um intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos.....	70
Figura 25. Concentração de ácido clavulânico em tampão Mcllvaine pH 6,5 frente à diferentes concentrações de Triton X-100 a 20 °C ao longo de 24 horas. As barras de erro correspondem a um intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos.....	70

Figura 26. Curva binodal para o tensoativo Triton X-114 em tampão Mcllvaine pH 6,5. As barras de erro correspondem a um intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos.	72
Figura 27. Curva binodal para o tensoativo Triton X-100 em tampão Mcllvaine pH 6,5. As barras de erro correspondem a um intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos	72
Figura 28. Curvas binodais para o tensoativo Triton X-114 na presença e ausência de 0,25M (NH ₄) ₂ SO ₄ , em tampão Mcllvaine pH 6,5. As barras de erro correspondem a um intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos.....	74
Figura 29. Curvas binodais para o tensoativo Triton X-100 na ausência e presença de 0,4, 0,8 e 1,2 M (NH ₄) ₂ SO ₄ , em tampão Mcllvaine pH 6,5. As barras de erro correspondem a um intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos.....	75
Figura 30. Curvas binodais para o tensoativo Triton X-114 na presença de 1, 4, e 8% polímero sulfato de dextrana, em tampão Mcllvaine pH 6,5. As barras de erro correspondem a um intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos ...	78
Figura 31. Curvas binodais para o tensoativo Triton X-100 na presença de 8 e 14% polímero sulfato de dextrana, em tampão Mcllvaine pH 6,5. As barras de erro correspondem a um intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos.....	78
Figura 32. Coeficientes de partição do ácido clavulânico (K _{AC}) em sistemas Triton X-114/tampão, nas concentrações de 2 e 4%(p/p) de tensoativo e temperaturas de 28, 31 e 34 °C, em tampão Mcllvaine pH 6,5. As barras de erro correspondem a um intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos.....	81
Figura 33. Balanços de Massa do ácido clavulânico (BM _{AC}) em sistemas Triton X-114/tampão, nas concentrações de 2 e 4%(p/p) tensoativo e temperaturas de 28, 31 e 34 °C, em tampão Mcllvaine pH 6,5. As barras de erro correspondem a um intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos.....	83
Figura 34. Rendimento do ácido clavulânico na fase diluída - Y _{clavd} (barra azul) e concentrada - Y _{clavc} (barra vermelha) em micelas, nos sistemas Triton X-114/tampão nas concentrações de 2 e 4% (p/p) tensoativo de e temperaturas de 28, 31 e 34 °C, em tampão Mcllvaine pH 6,5. As barras de erro correspondem a um intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos.....	83
Figura 35. Coeficientes de partição do ácido clavulânico (K _{AC}) em sistemas Triton X-114/0,25M (NH ₄) ₂ SO ₄ , nas concentrações de 2 e 4% (p/p) tensoativo e temperaturas de 18,6, 21,6 e 24,6 °C, em tampão Mcllvaine pH 6,5. As barras	

de erro correspondem a um intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos86

Figura 36. Balanço de massa do ácido clavulânico (BM_{AC}) em sistemas Triton X-114/0,25M $(NH_4)_2SO_4$, nas concentrações de 2 e 4%(p/p) tensoativo e temperaturas de 18,6, 21,6 e 24,6 °C, em tampão Mcllvaine pH 6,5. As barras de erro correspondem a um intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos88

Figura 37. Rendimento do ácido clavulânico na fase diluída - Y_{clavd} (barra azul) e concentrada - Y_{clavc} (barra vermelha) em micelas, nos sistemas Triton X-114/0,25 M $(NH_4)_2SO_4$ nas concentrações de 2 e 4% (p/p) tensoativo e temperaturas de 18,6, 21,6 e 24,6 °C, em tampão Mcllvaine pH 6,5. As barras de erro correspondem a um intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos.....88

Figura 38. Coeficientes de partição do ácido clavulânico (K_{AC}) em sistema Triton X-100/0,8 M $(NH_4)_2SO_4$, nas concentrações de tensoativo de 2 e 4% (p/p) e temperaturas de 33 e 39°C, em tampão Mcllvaine pH 6,5. As barras de erro correspondem a um intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos.....90

Figura 39. Coeficientes de partição do ácido clavulânico (K_{AC}) em sistemas com 4% (p/p) de Triton X-100, nas concentrações de 1,2 M e 1,6 M $(NH_4)_2SO_4$, e nas temperaturas de 17 e 3 °C, respectivamente, em tampão Mcllvaine pH 6,5. As barras de erro correspondem a um intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos.....92

Figura 40. Balanço de massa do ácido clavulânico (BM_{AC}) nos sistemas Triton X-100/0,8 M $(NH_4)_2SO_4$ a 33 e 39 °C, Triton X-100/1,2 M $(NH_4)_2SO_4$ a 17 °C e Triton X-100/1,6 M $(NH_4)_2SO_4$ a 3 °C, nas concentrações de 2 e 4% (p/p) tensoativo, em tampão Mcllvaine pH 6,5. As barras de erro correspondem a um intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos93

Figura 41. Rendimento do ácido clavulânico na fase diluída - Y_{clavd} (barra azul) e concentrada - Y_{clavc} (barra vermelha) em micelas, nos sistemas Triton X-100/0,8 M $(NH_4)_2SO_4$ a 33 e 39 °C, Triton X-100/1,2 M $(NH_4)_2SO_4$ a 17 °C e Triton X-100/1,6M $(NH_4)_2SO_4$ a 3 °C, nas concentrações de 2 e 4% (p/p) tensoativo, em tampão Mcllvaine pH 6,5. As barras de erro correspondem a um intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos93

Figura 42. Coeficientes de partição do ácido clavulânico (K_{AC}) em sistema Triton X-114/Dx-S, nas concentrações de 2 e 4% (p/p) tensoativo e 1, 4 e 8% (p/p)

sulfato de dextrana (Dx-S), em tampão Mcllvaine pH 6,5. As barras de erro correspondem a um intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos.....	95
Figura 43. Coeficientes de partição do ácido clavulânico (K_{AC}) em sistema Triton X-114/Dx-S, nas concentrações de 2 e 4% (p/p) tensoativo e 14% (p/p) sulfato de dextrana (Dx-S), em tampão Mcllvaine pH 6,5. As barras de erro correspondem a um intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos.....	96
Figura 44. Balanço de massa do ácido clavulânico (BM_{AC}) nos sistemas Triton X-114/Dx-S, em tampão Mcllvaine pH 6,5. As barras de erro correspondem a um intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos	99
Figura 45. Rendimento do ácido clavulânico na fase diluída - Y_{clavd} (barra azul) e concentrada - Y_{clavc} (barra vermelha) em micelas, nos sistemas Triton X-114/Dx-S, em tampão Mcllvaine pH 6,5. As barras de erro correspondem a um intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos	99
Figura 46. Coeficientes de partição do ácido clavulânico (K_{AC}) em sistema Triton X-100/DX-S, na concentração de 9% (p/p) tensoativo e 14% (p/p) do sulfato de dextrana (Dx-S), na ausência e presença de 0,1 M $(NH_4)_2SO_4$, em tampão Mcllvaine pH 6,5. As barras de erro correspondem a um intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos	101
Figura 47. Balanço de massa do ácido clavulânico (BM_{AC}) nos sistemas Triton X-100/Dx-S, na concentração de 9% (p/p) tensoativo e 14% (p/p) sulfato de dextrana (Dx-S), na ausência e presença de 0,1 M $(NH_4)_2SO_4$, em tampão Mcllvaine pH 6,5. As barras de erro correspondem a um intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos	104
Figura 48. Rendimento do ácido clavulânico na fase diluída - Y_{clavd} (barra azul) e concentrada - Y_{clavc} (barra vermelha) em micelas, nos sistemas Triton X-100/DX-S, na concentração de 9% (p/p) tensoativo e 14% (p/p) sulfato de dextrana (DX-S), na ausência e presença de 0,1 M $(NH_4)_2SO_4$, em tampão Mcllvaine pH 6,5. As barras de erro correspondem a um intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos	104

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Relação dos volumes para o preparo da solução tampão McIlvaine	53
Tabela 2. Condutância elétrica das fases diluída (F_d) e concentrada (F_c) dos ensaios em sistemas Triton X-114/sal.....	87
Tabela 3. Condutância elétrica das fases diluída (F_d) e concentrada (F_c) dos ensaios em sistemas Triton X-100/0,8 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	91
Tabela 4. Condutância elétrica das fases diluída (F_d) e concentrada (F_c) em micelas dos ensaios em sistemas Triton X-100/Dx-S.....	97
Tabela 5. Determinação da quantidade de tensoativo, em massa (mg), presente nas fases superior ($F_{\text{sup.}}$) e inferior ($F_{\text{inf.}}$) dos sistemas Triton X-114/Dx-S.....	98
Tabela 6. Condutância elétrica das fases diluída (F_d) e concentrada (F_c) em micelas dos ensaios em sistemas Triton X-100/14% Dx-S.....	102
Tabela 7. Determinação da quantidade de tensoativo, em massa (mg), presente nas fases superior ($F_{\text{sup.}}$) e inferior ($F_{\text{inf.}}$) dos ensaios em sistemas Triton X-100/Dx-S.	103

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....	18
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	20
2.1. Antibióticos.....	20
2.1.1. Ácido clavulânico	27
2.1.1.1 Ciclo de vida do <i>Streptomyces</i> sp.	30
2.1.1.2 Biossíntese do ácido clavulânico	30
2.1.1.3 Estabilidade do ácido clavulânico.....	32
2.1.2. Processos de isolamento e purificação do ácido clavulânico	34
2.2. Extração líquido-líquido de duas fases aquosas.....	38
2.2.1. Sistemas micelares de duas fases aquosas (SMDFA)	40
3. OBJETIVOS	52
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	53
4.1. Material	53
4.2. Métodos	54
4.2.1. Determinação da concentração do ácido clavulânico	54
4.2.2. Avaliação da estabilidade do ácido clavulânico em função da concentração de aditivos (sal e polímero), tempo, pH e temperatura	55
4.2.3. Avaliação da estabilidade do ácido clavulânico em função da concentração de Triton X-114 e Triton X-100	55
4.2.4. Construção das curvas binodais para os tensoativos Triton X-114 e Triton X-100	56
4.2.5. Ensaio de partição em sistema micelar de duas fases aquosas	57
4.2.6. Determinação da condutância elétrica das fases diluída e concentrada	58
4.2.7. Determinação da composição em massa das fases diluída e concentrada.....	58
4.5.1. Análise dos ensaios de partição.....	58
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	60
5.1. Avaliação da estabilidade do ácido clavulânico em diferentes pHs e temperaturas.....	60

5.2.	Avaliação da estabilidade do ácido clavulânico em diferentes concentrações do $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_2$	63
5.3.	Avaliação da estabilidade do ácido clavulânico em diferentes concentrações do sulfato de dextrana (Dx-S)	66
5.4.	Avaliação da estabilidade do ácido clavulânico em diferentes concentrações do Triton X-114 e Triton X-100	69
5.5.	Curvas binodais do Triton X-114 e Triton X-100	71
5.5.1	<i>Curvas binodais</i> - Triton X-114/tampão e Triton X-100/tampão.....	71
5.5.2	<i>Curvas binodais</i> - Triton X-114/ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_2$ e Triton X-100/ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_2$..	73
5.5.3	<i>Curvas binodais</i> - Triton X-114/Dx-S e Triton X-100/Dx-S.....	77
5.6.	Estudos das partições do ácido clavulânico.....	80
5.6.1	Partições - Triton X-114/tampão e Triton X-100/tampão.....	80
5.6.2	Partições - Triton X-114/sal e Triton X-100/sal	85
5.6.2.1	<i>Partições</i> - Triton X-114/ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_2$	85
5.6.2.2	<i>Partições</i> - Triton X-100/ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_2$	89
5.6.3	Partições - Triton X-114/Dx-S e Triton X-100/Dx-S	94
5.6.3.1	<i>Partições</i> - Triton X-114/DX-S.....	94
5.6.3.2	<i>Partições</i> - Triton X-100/DX-S.....	101
6.	CONCLUSÃO	106
	REFERÊNCIAS	108
	ANEXOS	124

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

O estudo da purificação do ácido clavulânico, obtido por bioprocesso, 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 muitos antibióticos comercializados. O ácido clavulânico é um antibiótico de atividade fraca, no entanto, constitui-se de um poderoso inibidor de enzimas β -lactamases produzidas por bactérias resistentes à penicilinas e cefalosporinas, através da produção de um intermediário acilado capaz de inativar essas enzimas (FOULSTONE; READING, 1982; BAGALLEY *et al.*, 1997).

Os métodos de purificação frequentemente utilizados para produtos biotecnológicos envolvem múltiplos passos cromatográficos tradicionais e, portanto, o desenvolvimento e aprimoramento de novas metodologias de purificação como extração líquido-líquido em duas fases aquosas representa uma iniciativa para a expansão de um processo alternativo de purificação. Os custos de preparações farmacêuticas são elevados e a pesquisa e desenvolvimento de técnicas mais econômicas e simplificadas para a purificação apresenta interesse considerável. Particularmente, o isolamento do ácido clavulânico do meio de fermentação é realizado em diversos passos. Ao final da fermentação, o caldo é clarificado por filtração ou centrifugação. De modo geral, o primeiro passo de purificação consiste em sucessivas etapas de extração líquido-líquido envolvendo solventes orgânicos. Um processo alternativo para evitar a utilização de solvente consiste na utilização de técnicas de cromatografia de adsorção. O ácido clavulânico, entretanto, não apresenta nenhum grupamento fortemente hidrofóbico e possui instabilidade química, o que resulta em baixos rendimentos nos processos de purificação. Portanto, devido à ampla utilização deste fármaco, novos métodos de purificação com melhores rendimentos e menor custo são de grande interesse.

Dentre os diferentes sistemas de extração líquido-líquido, o sistema micelar de duas fases aquosas é constituído de uma solução micelar homogênea que se separa em uma fase rica em micelas e uma fase pobre em micelas, dependendo das condições como temperatura, pH e força iônica. Portanto, este sistema oferece simultaneamente ambiente hidrofóbico e hidrofílico, o que permite seletividade na

partição de acordo com a hidrofobicidade das moléculas e dos contaminantes (BORDIER *et al.*, 1981; NIKAS *et al.*, 1992; RANGEL-YAGUI *et al.*, 2003). Dentro deste contexto, o presente trabalho propõe o estudo de sistemas micelares de duas fases aquosas como estratégia para purificação de ácido clavulânico. Mais especificamente, foi realizado um estudo detalhado da partição do ácido clavulânico em sistemas micelares constituídos por tensoativos não iônicos puros, na ausência e presença do sulfato de amônio $((\text{NH}_4)_2\text{SO}_4)$ ou de sulfato de dextrana (Dx-S), visando à futura aplicação dos sistemas para purificação do fármaco. Este estudo envolveu a construção de diagramas de fases, verificação das forças dominantes na partição e a busca por condições ideais que possam ser empregadas futuramente na extração/purificação do ácido clavulânico em maior escala.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Antibióticos

Antibióticos são metabólitos secundários produzidos por microrganismos ou por organismos específicos, ou ainda análogos sintéticos, obtido através de núcleos ativos destas substâncias, que possuem a capacidade de, em pequenas doses, inibir o crescimento e/ou sobrevivência dos agentes infecciosos, além de serem úteis no tratamento de algumas neoplasias, sem promover sérios efeitos tóxicos para o hospedeiro (WILLIAMS; LEMKE, 2002).

O primeiro antibiótico descoberto foi a penicilina, em 1928 por Alexander Fleming, que ao estudar a bactéria patogênica *Staphylococcus aureus*, observou a presença de lise bacteriana nas placas que haviam ficado expostas ao ar durante semanas, devido a um crescimento fúngico espontâneo como um contaminante. Fleming isolou o fungo, demonstrando que algum agente antibacteriano produzido por este causou a lise bacteriana. Mais tarde, o fungo foi identificado como sendo uma espécie rara de *Penicillium notatum* (posteriormente, renomeado *Penicillium chrysogenum*). Durante anos, Fleming dedicou-se ao trabalho de isolar e identificar o agente antibacteriano produzido pelo fungo em sua colônia de bactérias, entretanto, a substância mostrou-se muito instável e seu propósito não foi alcançado, concluindo que o composto seria inviável para ser utilizado clinicamente (PATRICK, 2008). Mais tarde, em 1938, Florey e Chain, um químico e um patologista, chegaram ao extrato bruto contendo a penicilina, o qual após três anos foi testado clinicamente, obtendo-se grande sucesso e sendo o primeiro antibiótico a se tornar disponível para uso clínico em 1942. Por este trabalho, Fleming, Florey e Chain dividiram o Prêmio Nobel de Medicina em 1945 (OLIVEIRA *et al.*, 2009).

Na década de 40, Selman Waksman, bioquímico e microbiologista, descobriu uma série de novos antibióticos produzidos por bactérias provenientes do solo, como a actinomicina, estreptomicina e neomicina. A descoberta da estreptomicina, o primeiro antibiótico eficaz contra a tuberculose, proporcionou a Waksman o Prêmio Nobel de Medicina em 1952 (ROKEM *et al.*, 2007).

Durante os anos de 1950 e 1960, muitos medicamentos antibacterianos (por exemplo, tetraciclina, eritromicina e kanamicina), antifúngicos (por exemplo, candididina e nistatina), e antineoplásicos (por exemplo, adriamicina) foram

descobertos tanto por pesquisas acadêmicas quanto por pesquisas realizadas industrialmente (CHALLIS; HOPWOOD, 2003). Após a década de 70, a taxa de descoberta de novas moléculas, a partir de micro-organismos, caiu drasticamente (DEMAIN, 2007) e, dessa forma, a alternativa para a obtenção destas moléculas consistiu na síntese laboratorial, que também contribuiu para a melhoria dos rendimentos obtidos por bioprocessos. Embora muitas classes de antibióticos em uso clínico sejam produtos naturais ou derivados semissintéticos, atualmente há cerca de três classes de antibióticos sintéticos ou, mais corretamente, antibacterianos: sulfas, quinolonas e as oxazolidinonas, introduzidas nos Estados Unidos, nos anos de 1930, 1960 e 2000, respectivamente (WALSH, 2003).

A variedade e complexidade dos antibióticos produzidos são enormes. Mais da metade destes fármacos aprovados entre 1981 e 2002 são baseados em compostos naturais. Assim, produtos naturais continuam desempenhando um papel importante na descoberta de novas moléculas. Seis de doze antibacterianos e antifúngicos aprovados entre os anos de 2001 a 2005, pelo FDA (*Food and Drug Administration*), originaram-se de produtos naturais ou derivados destes (BUTLER; BUSS, 2006).

Devido à ampla variedade de estruturas químicas encontradas nos antibióticos e antifúngicos, estes podem ser divididos de acordo com suas classes químicas: β -lactâmicos, peptídeos, glicopeptídeos, alcalóides, aminoglicosídeos, terpenos, quininas, policetídeos e cumarínicos (ROKEM *et al.*, 2007). Estes antibióticos também podem ser agrupados de acordo com o seu alvo terapêutico, sendo que, cinco grandes alvos são conhecidos: (1) inibição da biossíntese da parede celular bacteriana, pelos antibióticos β -lactâmicos, como penicilinas e cefalosporinas, e pelos glicopeptídeos como a vancomicina e a teicoplanina; (2) bloqueio seletivo dos ribossomos bacterianos na subunidade 30S, por aminoglicosídeos e tetraciclinas e na subunidade 50S pelos antibióticos macrolídeos; (3) bloqueio da replicação do DNA bacteriano por DNA topoisomerase, pelas quinolonas; (4) bloqueio da via biossintética da coenzima folato, essencial para proporcionar unidades monoméricas para a síntese de DNA por fármacos, como a classe das sulfas; e (5) perturbação da integridade da membrana bacteriana por antibióticos polipeptídeos (WALSH, 2003).

Em 2004, o mercado global de fármacos anti-infecciosos encontrava-se em torno de US\$ 55 bilhões, representado por 62% de antibacterianos, 13% soros,

imunoglobulinas e vacinas, 12% antivirais anti-HIV, 7% antifúngicos e 6% de outros antivirais (DEMAIN, 2007). Os antibióticos correspondem a 12% de todas as prescrições ambulatoriais nos Estados Unidos, o que gera um dispêndio de 15% dos US\$ 100 bilhões gastos anualmente com medicamentos (PITLOVANCIV, 2005). Em 2002, o Ministério da Saúde investiu R\$ 3 bilhões na aquisição de medicamentos, sendo 11,1% desse total gasto com medicamentos essenciais (antibióticos, analgésicos, antitérmicos, antidepressivos e outros), 33,24% em medicamentos de programas estratégicos (AIDS, tuberculose, hanseníase, malária, esquistossomose, tracoma, leishmaniose, meningite, cólera, filariose, diabetes e hemofilia), 16,32% com medicamentos excepcionais (para tratamento de doenças crônicas e de alto custo), sendo o restante equivalente a 39,33% destinado à compra de fármacos de uso hospitalar. Entre 2002 e 2006, o gasto total em medicamentos do Ministério da Saúde aumentou em 115% (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009). Dentre os cinco grupos de antibióticos mais importantes, tanto no aspecto terapêutico quanto comercial, destacam-se os antibióticos pertencentes à família dos β -lactâmicos, como penicilinas e cefalosporinas. Neste mesmo período (2002-2006), o Brasil importou cerca de US\$ 71 milhões (aproximadamente 1,7 toneladas) em medicamentos baseados em penicilinas naturais e derivados e cerca de US\$ 174,5 milhões (aproximadamente 1,6 toneladas) em compostos com base em cefalosporinas e cefamicinas naturais e semissintéticas (HOKKA *et al.*, 2010).

Em 2009, o mercado de antibióticos gerou vendas de US\$ 42 bilhões no mundo, representando cerca de 50% das vendas de fármacos anti-infecciosos (que incluem também fármacos antivirais e vacinas) e 5% do mercado farmacêutico mundial. No entanto, o mercado de antibióticos está amadurecendo, dado comprovado pelo crescimento médio anual de 4%, quando comparado com um crescimento de 16,7% e de 16,4% para medicamentos antivirais e vacinas, respectivamente. Em termos de vendas (Figura 1), as penicilinas, incluindo as de amplo e menor espectro, representam a maior classe de antibióticos, gerando US\$ 15,1 bilhões, em 2009. Esta classe corresponde a 36% do mercado total de antibióticos e suas vendas apresentaram um crescimento de 5% entre os anos de 2005 e 2009. Com vendas em torno de US\$ 11,8 bilhões e 28% do mercado de antibióticos, a segunda maior classe são as cefalosporinas, que apresentaram um crescimento de 3,4% (HAMAD, 2010).

FIGURA 1 - Porcentagem de vendas de antibióticos por classe no ano de 2009. (Adaptado de Hamad, 2010).

Embora exista uma grande variedade de fármacos com função antibiótica em uso clínico e vários outros em desenvolvimento, há ainda grande demanda por novos compostos, devido ao aumento no número de bactérias patogênicas resistentes a agentes antimicrobianos. Neste sentido, a diversidade de estruturas e alvos terapêuticos produzidos através do metabolismo secundário de bactérias e outros micro-organismos poderiam suprir esta demanda ou minimizar este problema relacionado à resistência bacteriana (HARVEY, 2000).

Os antibióticos β-lactâmicos são assim denominados por possuírem um anel β-lactâmico como parte de um sistema de anéis heterocíclicos (PELCZAR *et al.*, 1996). Ao anel β-lactâmico, diferentes estruturas podem estar conectadas, dividindo estes antibióticos em cinco classes principais: penicilinas, cefalosporinas, carbapenemas, clavams e monobactâmicos (COULTHURST *et al.*, 2005). Sua ação se dá através da interferência no maquinário metabólico responsável pelo crescimento e desenvolvimento da parede celular bacteriana (CHARNAS; KNOWELS, 1981). O alvo desses compostos β-lactâmicos é a reação de transpeptidação (MADIGAN *et al.*, 1997). Esse mecanismo baseia-se na união de β-lactâmicos a alvos específicos localizados na superfície interna da membrana celular bacteriana, denominados *Penicillin Binding Proteins* (PBPs). As PBPs possuem um papel chave nas fases finais da síntese do peptidoglicano, um complexo polimérico formado por peptídeos e cadeia de açúcares, responsável pela estruturação e

rigidez da parede celular bacteriana. A estrutura da parede celular consiste de um esqueleto de açúcares, contendo dois tipos de açúcares, composto de ácido *N*-acetilmurâmico (NAM) e *N*-acetilglicosamina (NAG). As cadeias de peptídeo são ligadas ao NAM e, no passo final da biossíntese da parede celular, essas cadeias de peptídeos se ligam pela substituição da D-alanina de uma cadeia pela glicina de outra cadeia. A enzima responsável pela reação de ligação cruzada, uma PBP, é conhecida como transpeptidase (Figura 2). Esse é o passo final da reação cruzada que é inibido pelas penicilinas e cefalosporinas, de forma que a estrutura da parede celular não fique unida, e como resultado, a parede celular torna-se frágil (PATRICK, 2008).

FIGURA 2 - Esquema das ligações cruzadas para a construção da parede celular bacteriana (Adaptado de Oliveira *et al.*, 2009).

Mais especificamente, a penicilina apresenta conformação semelhante à terminação D-Ala-D-Ala envolvida na reação cruzada. Como este é o centro de reação catalisada pela transpeptidase, essa é uma teoria bastante interessante, já que se acredita que a unidade D-Ala-D-Ala é substituída por moléculas de penicilina

e, portanto, a reação enzimática ocorre com a penicilina ao invés do aminoácido (OLIVEIRA *et al.*, 2009).

No mecanismo normal, a ligação amida entre as duas unidades alanina é clivada. A unidade alanina terminal sai do sítio ativo, deixando a cadeia peptídica ligada ao mesmo. A glicina terminal da cadeia pentaglicil entra no sítio ativo e forma uma ligação peptídica com o grupo alanina, removendo o outro grupo alanina do sítio. A enzima pode atacar o anel β -lactâmico da penicilina e abrir o anel da mesma forma que é feito com a ligação amida. Entretanto, como a penicilina é cíclica, essa não é dividida e subsequentemente, a hidrólise do grupo acila não ocorre, provavelmente porque a glicina não é capaz de chegar até o sítio de reação, pois a molécula de penicilina impede seu acesso (Figura 3).

FIGURA 3 - Mecanismo de ação normal e mecanismo inibido pela molécula de penicilina (OLIVEIRA *et al.*, 2009).

Para que ocorra a ação dos antibióticos β -lactâmicos no organismo, este deve primeiramente penetrar na parede celular bacteriana. Como a camada glicopeptídica da parede celular das bactérias Gram-positivas é espessa e externa a uma membrana celular única quando comparada à camada glicopeptídica das bactérias Gram-negativas, que é muito mais delgada e encontra-se entre a membrana

plasmática e a membrana celular externa, os antibióticos β -lactâmicos (considerados de primeira e segunda geração), a princípio, podem atuar mais facilmente nas bactérias Gram-positivas (KONEMAN *et al.*, 2001). Embora, atualmente alguns antibióticos (denominados β -lactâmicos de terceira geração) penetrem nas bactérias Gram-negativas através de porinas.

Os antibióticos β -lactâmicos constituem uma alternativa importante para o tratamento de muitas infecções. Infelizmente, tanto bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus licheniformes*, *Mycobacterium* sp.) quanto Gram-negativas (*Escherichia coli*, *Proteus* sp., *Klebsiella aerogenes*, *Enterobacter cloacae*, *Pseudomonas aeruginosa*) têm desenvolvido resistência a estes antibióticos, sendo que três mecanismos são descritos como os responsáveis pela resistência: (1) alteração nas *Penicillin Binding Proteins* (PBPs); (2) o difícil acesso dos antibióticos β -lactâmicos ao interior celular (eliminação de porinas ou outras proteínas de membrana); (3) e principalmente, a ativação de enzimas β -lactamases, que clivam o anel β -lactâmico destes antibióticos fazendo com que os mesmos percam a atividade antibacteriana (READING; COLE, 1977).

Existem vários tipos de β -lactamases, que são classificadas ou pela sua sequência de aminoácidos, ou pela produção de substratos correspondentes (STAPLETON *et al.*, 1999). A primeira β -lactamase identificada foi em *Escherichia coli*, durante estudos para a utilização da penicilina na prática médica. A síntese dessas enzimas é induzida tanto pela presença de antibióticos β -lactâmicos quanto pela presença de precursores da parede celular do meio extracelular (NAGANO *et al.*, 1999). O grau de resistência bacteriana depende da quantidade da enzima produzida, da habilidade dessa enzima em hidrolisar o anel β -lactâmico do antimicrobiano e da velocidade com que este antibiótico penetra pela membrana externa da bactéria (BRADFORD, 2001). Atualmente mais de 450 subtipos de β -lactamases encontram-se descritas e, portanto, estratégias para inativar essas enzimas têm assumido uma importância crítica na área médica (BETHEL *et al.*, 2004). Apesar do aumento da resistência bacteriana, causada por estas enzimas, os antibióticos β -lactâmicos continuam sendo importantes na terapia antimicrobiana em muitas situações, devido a sua eficácia e segurança, o que leva a indústria farmacêutica a buscar estratégias para conter a expansão destas β -lactamases, garantindo a continuidade da terapia antimicrobiana dos β -lactâmicos com melhores

resultados clínicos. Uma destas estratégias consiste em alterar a estrutura do β -lactâmico, tornando-o insensível à hidrólise pelas β -lactamases, embora mantendo o 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 associar à terapia antimicrobiana, compostos que potencializam a ação dos antibióticos β -lactâmicos por diminuírem a resistência bacteriana, como é o caso do ácido clavulânico (OLIVEIRA, 2004).

2.1.1 Ácido clavulânico

De todos os antibióticos produzidos por microrganismos 66% são de actinomicetos, 22% de fungos e 12% de outras bactérias. Dentre os actinomicetos, 80% são obtidos a partir do gênero *Streptomyces*, como o ácido clavulânico, um produto do metabolismo secundário destes micro-organismos (OLIVEIRA *et al.*, 2009). Esse metabólito secundário, de ocorrência natural, foi detectado pela primeira vez em culturas de *Streptomyces clavuligerus*, por pesquisadores do *Beecham Laboratories* na Inglaterra (BROWN *et al.*, 1976; BUTTERWORTH, 1984). Em 1971, foi isolado através de um programa de *screening* para a seleção de substâncias naturais com potencial inibição de β -lactamases (NAGARAJAN *et al.*, 1971; FINLAY *et al.*, 2003). A seleção do micro-organismo *Streptomyces clavuligerus* para a triagem inicial foi devido à sua habilidade de produzir cefamicina C, um produto bioativo resistente à β -lactamases. A partir deste fato, um número de outras espécies que produzem metabólitos tipo clavam (que são estruturalmente relacionados com o ácido clavulânico) tem sido descritas. Porém, o ácido clavulânico com a sua estereoquímica 2S, 5R é o único entre estes metabólitos que apresentam atividade inibitória de β -lactamase (SAUDAGAR *et al.*, 2008).

O ácido clavulânico é uma substância β -lactâmica formada por um anel bicíclico: o anel β -lactâmico condensado ao anel oxazolidínico, que difere das penicilinas e cefalosporinas por possuir um átomo de oxigênio no lugar de um átomo de enxofre (anel tiazolidínico) (HOWART *et al.*, 1976; BUTTERWORTH, 1984). Sua estrutura química pode ser observada na Figura 4.

FIGURA 4 - Estrutura química do ácido clavulânico.

Na presença de baixas concentrações de ácido clavulânico, muitas bactérias produtoras de β -lactamases tornam-se sensíveis às penicilinas e cefalosporinas comercialmente disponíveis. É considerado um antibiótico de atividade fraca (Concentração Inibitória Mínima, CIM, de 25 - 125 $\mu\text{g/mL}$) quando comparado a outros antibióticos como a amoxicilina e a associação trimetropima/sulfadiazina, que apresentam valores de CIM de 1 - 2 $\mu\text{g/mL}$ e 2 - 8 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente (SALVARANI *et al.*, 2008). Entretanto, o ácido clavulânico é considerado um poderoso inibidor de β -lactamases e, segundo Payne *et al.* (1994), apresenta atividade inibitória quase 5 vezes maior que o tazobactam e quase 600 vezes maior que o sulbactam (ácido clavulânico = 0,03 mM; tazobactam = 0,14 mM; sulbactam = 17 mM).

Quando utilizado em combinação com penicilinas e cefalosporinas, o ácido clavulânico liga-se irreversivelmente à serina do grupo hidroxila do centro ativo das β -lactamases, produzindo um intermediário acilado estável, inativando a enzima e permitindo, assim, que o antibiótico atue no combate à infecção (Figura 5) (FOULSTONE; READING, 1982; BAGGALEY *et al.*, 1997).

FIGURA 5 - Mecanismo de ação do ácido clavulânico, por inibição irreversível da enzima β -lactamase (PATRICK, 2008).

O ácido clavulânico em forma de sal potássico (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 da associação entre o ácido clavulânico e a amoxicilina, sendo o medicamento referência para o desenvolvimento de inúmeros medicamentos genéricos por indústrias farmacêuticas como a Novartis, EMS, Medley, Ranbaxy, Eurofarma e Sandoz (ANVISA, 2009). Esta combinação do ácido clavulânico com a amoxicilina é o exemplo de maior sucesso do uso de um antibiótico β -lactâmico sensível a β -lactamase, juntamente com um inibidor desta enzima (OLIVEIRA *et al.*, 2009). Atualmente, algumas indústrias que produzem o ácido clavulânico estão localizadas em países como Portugal (Companhia Industrial Portuguesa de Antibióticos - CIPAN), Índia e China.

2.1.1.1 Ciclo de vida do *Streptomyces* sp.

O ácido clavulânico é obtido através de bioprocesso, realizado por várias espécies de *Streptomyces* sp., dentre elas, a *Streptomyces clavuligerus*, uma bactéria filamentosa, gram-positiva, aeróbia estrita, sendo encontrada predominantemente no solo (LECHEVALIER, 1981). Estes microorganismos apresentam um ciclo de vida complexo, que se inicia com a germinação dos esporos até a formação de um micélio vegetativo formado por hifas primárias, em um ambiente que requer fontes de nitrogênio e carbono como suprimentos (ENSIGN, 1978; HARDISSON *et al.*, 1978). A fase vegetativa consiste em uma matriz complexa, fortemente entrelaçada, isto é, um micélio compacto e convoluto que, subsequentemente, origina uma colônia. Nesta fase estacionária do crescimento é que ocorre a produção da maioria dos metabólitos secundários com atividade antibiótica (DEMAIN, 1989). À medida que a colônia envelhece, do micélio vegetativo surge o micélio aéreo ou esporóforo, que originará as células individuais na forma de esporos (FLARDH, 2003). Atualmente sabe-se que esta bactéria é capaz de produzir cerca de 20 metabólitos secundários, incluindo vários compostos β -lactâmicos, como a penicilina N, a cefamicina C e a desacetoxicefalosporina C (ORTIZ, 2005).

2.1.1.2 Biossíntese do ácido clavulânico

A biossíntese do ácido clavulânico, bem como os mecanismos isolados que envolvem este bioprocesso vem sendo recentemente elucidados e compreendidos. A maior contribuição para o esclarecimento das lacunas existentes nesta rota biossintética (Figura 6) ocorre através de estudos relacionados com o isolamento dos intermediários metabólicos, a purificação e a caracterização das enzimas que participam do processo e os estudos genéticos.

De acordo com Romero *et al.* (1986), a biossíntese do ácido clavulânico é dependente da concentração de dois aminoácidos, a arginina e ornitina, que são incorporados na molécula deste metabólito secundário durante o bioprocesso. Muitos autores investigaram a atividade da ornitinacarbamil transferase, do *Streptomyces clavuligerus*, uma enzima que possui atividade arginase, com

capacidade de converter a arginina em ornitina. De La Fuente *et al.* (1996) verificaram que a incorporação da arginina na molécula de ácido clavulânico não estabeleceu a ornitina como um precursor direto na biossíntese do fármaco, ao contrário do que era esperado devido à atividade arginase da enzima. Este estudo foi comprovado por Valentine *et al.* (1993), que utilizaram mutantes bloqueados nos genes *argF* e *argG*, os quais foram incapazes de converter a arginina em ornitina e mesmo assim encontraram uma boa incorporação da arginina marcada isotopicamente na molécula de ácido clavulânico e uma baixa incorporação de ornitina. Isto demonstra que a arginina é o precursor direto do ácido clavulânico e que possui uma reduzida atividade arginase, produzindo quantidade insuficiente de ornitina para incorporar na molécula do ácido clavulânico. Nesta mesma proposta, Townsend *et al.* (1965) também sugeriram como precursor a arginina e um outro composto orgânico, o ácido pirúvico ou piruvato, na síntese do ácido clavulânico.

FIGURA 6 – Via biossintética da produção de ácido clavulânico em *S. clavuligerus*. (OLIVEIRA *et al.*, 2009).

Os primeiros intermediários isolados de *S. clavuligerus* foram os ácidos clavamínico e proclavamínico, com posterior identificação de outros dois compostos pertencentes à biossíntese do ácido clavulânico, o N₂ -(2-carboxietil)-arginina (CEA) e o ácido desoxiguanidino (DGPC). A enzima clavaminato sintase (CAS) foi descrita por converter o ácido proclavamínico em ácido clavamínico, entretanto, um estudo realizado por Salowe *et al.* (1990), revelou que havia duas formas dessa mesma enzima, cujas diferenças estavam nas propriedades cinéticas e no seu tamanho (massa molar). Acredita-se que uma das formas da CAS faça parte da biossíntese do ácido clavulânico, enquanto a outra esteja associada à produção de outras moléculas clavams. Na última etapa, o ácido clavamínico é convertido a ácido clavulânico, através de um aldeído intermediário, na presença de NADPH, que reduz o clavaldeído, através da enzima clavaldeído redutase (CAR), à ácido clavulânico. O ácido clavamínico difere do ácido clavulânico na estereoquímica dos anéis e a conversão desta molécula a ácido clavulânico requer a inversão na estereoquímica do anel, bem como a conversão de um grupo amino da cadeia lateral para um grupo hidroxila, porém esta reação ainda não foi muito bem elucidada (OLIVEIRA *et al.*, 2009).

Mesmo apesar destes estudos, pouco se sabe sobre a regulação da produção do ácido clavulânico, existindo controvérsias a respeito dos substratos que favorecem ou não a produção do mesmo. Os meios de cultivos, encontrados na literatura para a produção de ácido clavulânico são constituídos, principalmente, de derivados de soja e glicerol como principal fonte de proteínas e carbono, respectivamente. A utilização do glicerol se faz necessária devido à incapacidade do *Streptomyces clavuligerus* metabolizar fontes simples de carbono, como a glicose, sendo que a adição de óleo de soja ao meio de fermentação como fonte secundária de carbono acarreta em um aumento na produção do fármaco (ELSON; OLIVER, 1978; BUTTERWORTH, 1984; GOUVEIA *et al.*, 1999; MARANESI *et al.*, 2005; ORTIZ *et al.*, 2007).

2.1.1.3 Estabilidade do ácido clavulânico

Assim como outros compostos β -lactâmicos, o ácido clavulânico é uma molécula quimicamente instável, devido à presença do grupo carbonila do anel β -

lactâmico ser susceptível ao ataque por hidroxilas livres, outros grupamentos nucleofílicos e por moléculas de água (KONECNY *et al.*, 1975). Esse composto não possui nenhum grupo fortemente hidrofóbico e apresenta velocidades de degradação elevadas em meios básicos ($\text{pH} > 7,5$) e ácidos ($\text{pH} < 4,5$) (BERSANETTI *et al.*, 2005), o que leva a rendimentos de recuperação considerados baixos durante os processos de purificação e principalmente de extração, quando comparados a outros compostos β -lactâmicos (MAYER *et al.*, 1997).

Muitos autores investigaram a estabilidade do ácido clavulânico frente a diferentes valores de pH. Estes autores observaram que a degradação do ácido clavulânico segue uma cinética de pseudoprimeira ordem e que o processo é diretamente influenciado pela concentração de sais presente nos tampões utilizados para manter valores constantes de pH. Bersanetti *et al.* (2005) verificaram que a estabilidade do ácido clavulânico a 20 °C e força iônica $\mu = 0,5$ é maior em $\text{pH} = 6,2 - 7,0$ e que a degradação ocorre mais rapidamente em soluções básicas ($\text{pH} \geq 8,0$) do que em soluções ácidas ($\text{pH} \leq 4,0$). Estes autores também verificaram que as constantes de degradação do ácido clavulânico em soluções aquosas são menores ($k \sim 0,017$) em relação às soluções obtidas do meio de fermentação ($k \sim 0,042$), devido à presença de outros componentes do meio, tal como, sais de amônio.

Haginaka *et al.* (1981) estudaram a degradação do ácido clavulânico frente a temperaturas 35, 60 e 100 °C e valores de pH entre 3,1 a 10,1. Foi possível concluir que valores máximos para a manutenção da estabilidade do ácido clavulânico ocorrem a temperaturas $\leq 35^\circ\text{C}$, com uma força iônica $\mu = 0,5$ e pH em torno de 6,39, sendo a taxa de degradação constante e dependente do pH e da temperatura do meio. Além disso, concluíram que a constante de velocidade de degradação aumenta ($k = 0,026$ para 0,055 e $k = 0,655$ para 1,04), com o aumento da concentração do tampão (de 0,1 M para 0,3 M) fosfato e citrato, respectivamente. Estes mesmos autores estudaram a degradação do ácido clavulânico em solução aquosa levemente alcalina a várias temperaturas e identificaram quatro produtos de degradação, como sendo os compostos 2,5-bis-(2-hidroxietil) pirazina, 3-metil-2,5-bis-(2-hidroxietil) pirazina, 3-carboxietil-2,5-bis-(2-hidroxietil) pirazina e 3-etil-2,5-bis-(2-hidroxietil) pirazina. Frente à temperatura de 35°C não foi observada a formação do 3-metil-2,5-bis-(2-hidroxietil) pirazina, mas a 60 °C todos os produtos foram observados e a 100°C o produto 3-(2-carboxietil)-2,5-bis-(2-hidroxietil) pirazina não é formado. Um estudo realizado por Finn *et al.* (1984) identificou e caracterizou o

produto majoritário da degradação do ácido clavulânico, como sendo uma amino cetona estável, resultante da hidrólise do ácido clavulânico em meio ácido. Em soluções neutras ou básicas é esperado que este composto sofra uma reação de condensação intermolecular, originando uma pirazina.

Mayer e Deckwer (1996) estudaram a produção e a degradação do ácido clavulânico durante o cultivo de *Streptomyces clavuligerus* em meios complexos de soja. Os autores concluíram que a constante de degradação para o ácido clavulânico *in vivo* foi de 2 a 10 vezes superior à obtida *in vitro* (ácido clavulânico grau farmacêutico). Enquanto a hidrólise ácida pareceu ser responsável pela instabilidade do ácido clavulânico *in vitro*, como indicado pela influência do pH na constante de degradação, outros mecanismos adicionais, relacionados aos diversos componentes e condições do meio de cultivo, foram ativados na degradação do ácido clavulânico durante as culturas em meio de extrato de soja.

Santos *et al.* (2009) investigaram a estabilidade do ácido clavulânico frente às variáveis como pH (4,0 - 8,0), concentração de sais (0,1 e 0,5 M) e temperatura (20 - 45 °C). As melhores condições encontradas foram $6,0 \leq \text{pH} \leq 7,2$ a 20 °C no tempo de 3 - 6 horas, com valores de estabilidade em torno de 90%. Quando a temperatura foi aumentada para 45 °C, verificou-se uma maior degradação do fármaco na faixa de pH mais extrema como 4,0 e 8,0, chegando a valores de estabilidade em torno de 20 e 40%, respectivamente. Em relação à presença de sais no sistema, verificou-se uma diminuição na estabilidade do ácido clavulânico (em torno de 10%) com o aumento da força iônica do sal estudado, sendo a estabilidade do fármaco afetada pelos sais em ordem decrescente $\text{Na}_2\text{SO}_4 > \text{MgSO}_4 > \text{CaCl}_2 > \text{NaCl}$.

2.1.2 Processos de isolamento e purificação do ácido clavulânico

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

Muitas patentes descrevem a extração do ácido clavulânico do caldo de fermentação por diferentes métodos, geralmente com a utilização de solventes orgânicos. Cole *et al.* (1978) e Box *et al.* (1978) escreveram um processo de

extração por solvente, no qual a remoção das células do meio é realizada através de filtração ou centrifugação. Iniciou-se a extração do ácido clavulânico em pH ácido (em torno 2 - 3) com a utilização de solvente orgânico (como acetato de etila, *n*-butanol, metil isobutilcetona, acetato de *n*-butila, entre outros) seguido de uma re-extração da fase orgânica, com uma fase aquosa (como solução tampão fosfato ou uma solução de bicarbonato de sódio ou carbonato de cálcio) no pH em torno de 7. O extrato aquoso foi concentrado, utilizando pressão reduzida, a um sal de ácido clavulânico sólido e estável a - 20 °C, sendo a purificação realizada através de uma resina de troca iônica. Um estudo realizado por Mayer *et al.* (1997) comparou esse sistema de resina de troca iônica Amberlite IRA 400 com um sistema de troca iônica com resinas Amberlite XAD. Neste sistema, as resinas XAD foram testadas em combinação com sais de amônio quaternário com diferentes polaridades, capazes de formar pares iônicos com o grupo ácido do fármaco, apresentando melhores resultados que o primeiro método de purificação. Com isso, estes autores concluíram que este tipo de cromatografia por sistema de troca-iônica é uma alternativa viável e eficiente na purificação do ácido clavulânico.

Nabais e Cardoso (1995) estudaram a ultrafiltração de caldos fermentados e a utilização de solventes orgânicos na extração de antibióticos β -lactâmicos. Os autores compararam a extração do ácido clavulânico com *n*-butanol em solução aquosa pH 2, proveniente de dois processos diferentes: meio fermentado filtrado com adição de auxiliar de filtração (como floculantes e filtros rotativos à vácuo) e meio fermentado ultrafiltrado. Os resultados encontrados para a extração global do antibiótico nos dois meios 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, sendo necessária uma concentração deste antes da etapa de extração por solvente.

Alves *et al.* (2002) também avaliaram o desempenho da ultrafiltração para isolar o ácido clavulânico de caldos fermentados industriais. O estudo foi realizado utilizando membranas tubulares de cerâmica com valores de *cut off* de 15 e 150 kDa e membranas de folha plana com valores de *cut off* de 5 e 20 kDa. De acordo com os resultados, estes experimentos mostraram que a utilização de membranas de 15 kDa quanto de 20 kDa, diretamente para separação sólido-líquido, oferecem um bom desempenho no processo de separação. Entretanto, a utilização de

membranas de 5 kDa, não promoveu um aumento no poder de separação e, portanto, no rendimento do processo. Como era esperado, as membranas com altos valores de *cut off*, como de 150 kDa, proporcionaram altos fluxos de permeação, ocasionando uma pobre separação de fases devido à presença de proteínas contaminantes do meio de cultivo. Assim, os autores concluíram que o isolamento do ácido clavulânico do meio fermentado pode ser realizado com somente dois passos, sendo o primeiro uma separação sólido - líquido por ultrafiltração usando uma membrana de 15 kDa de *cut off*, seguida de uma concentração obtida por nanofiltração, já que os permeados são geralmente soluções muito diluídas do fármaco.

Outros autores reportaram processos de extração de ácido clavulânico utilizando solventes orgânicos, com posterior formação de éster e sais de ácido clavulânico (SIMON, 2001). Essa patente sugeriu a conversão do ácido clavulânico ou do sal clavulanato em um éster, através de uma reação de esterificação, com purificação por cromatografia de permeação em gel (GPC). O éster obtido pode ser convertido em clavulanato de sódio ou potássio em solução de bicarbonato de sódio e etanol, com recuperação do sal por cristalização. Outras patentes de Fleming *et al.* (1979) e (1983) sugeriram a purificação do ácido clavulânico através da conversão em clavulanato de lítio com subsequente precipitação, a qual geralmente ocorre na forma cristalina. Esta precipitação ocorre devido à grande afinidade dos íons clavulanato pelos cátions lítio, juntamente com uma insignificante co-precipitação de impurezas. A diminuição da temperatura (para cerca de 0 - 5°C) bem como a adição de solventes orgânicos, como acetona, metanol, etanol, contribui para a redução da solubilidade do clavulanato, com o alcance de uma máxima precipitação do sal.

Outro conhecido processo de purificação alternativa para o ácido clavulânico envolve o uso de aminas orgânicas para formação de sais e/ou outros derivados com o ácido clavulânico. Patentes como Capuder *et al.* (1998) e (2001), Simon *et al.* (2001) e Callewaert *et al.* (1998), sugerem a formação de um sal de amina do ácido clavulânico, visando a redução da instabilidade da reação, através do isolamento deste intermediário e sua reconversão em ácido clavulânico, com um alto teor de pureza (~ 70%). Entretanto, outros autores descreveram que, em geral, a maioria das aminas é inadequada para a produção do sal de clavulanato, pois estes sais de amina são altamente tóxicos e higroscópicos, necessitando de grandes quantidades de solventes para que ocorra sua solubilização, com posterior obtenção do

clavulanato de potássio (KIM *et al.*, 1995). HIRATA *et al.* (2009) descreveram detalhadamente a precipitação do ácido clavulânico proveniente do caldo de fermentação utilizando o sal 2-etilexanoato de potássio. Estes autores, examinaram a influência de diferentes concentrações do fármaco e do sal durante as reações de precipitação e verificaram que a concentração combinada de 15 mg/mL ácido clavulânico (sendo o solvente orgânico acetato de etila) e 0,3 M de 2-etilexanoato de potássio favoreceu a precipitação de clavulanato de potássio com elevado grau de pureza e rendimento em torno de 70%. Este estudo indicou que as concentrações dos reagentes interferem no rendimento, na estabilidade e na purificação dos cristais obtidos. Este trabalho foi o pioneiro em fornecer detalhes sobre os métodos de isolamento, a melhor condição para se efetuar a reação de precipitação do clavulanato de potássio, bem como as análises por Ressonância Magnética Nuclear (RMN), realizadas para a identificação do clavulanato de potássio obtido.

Videira e Aires-Barros (1994) estudaram um sistema de duas fases aquosas, constituído de polietilenoglicol (PEG) e tampão fosfato para a extração e purificação do ácido clavulânico. Nestes estudos, verificou-se que o clavulanato de potássio apresenta grande afinidade pela fase rica em PEG com elevados coeficientes de partição ($K = 1,5 - 114$) e valores altos de rendimento em torno de 99%. Foi observado um aumento do coeficiente de partição do fármaco para a fase rica em polímero com o aumento da massa molar do polímero, em valores de pH mais extremos, isto é, em torno de 8, no qual o fármaco está predominantemente na sua forma ionizada. Brites *et al.* (2005) compararam a extração líquido-líquido de ácido clavulânico obtido do caldo fermentado, por solvente orgânico e por sistema de duas fases aquosas (SDFA). No sistema por extração utilizando solventes orgânicos, como acetato de etila, acetato de butila, *n*-butanol e 2-butanol em diferentes pHs (de 2 a 5). Os melhores resultados obtidos foram no pH em torno de 2 (valor próximo ao pK_a do ácido clavulânico que é em torno de 2,25) sendo o melhor solvente em termos de coeficiente de partição, o *n*-butanol ($K_{AC} = 1,37$), seguido do 2-butanol ($K_{AC} = 0,91$) e acetato de etila ($K_{AC} = 0,58$). Para os sistemas de duas fases aquosas constituídos por PEG de diferentes massas molares (400, 600, 1000, 4000 e 6000) e soluções fosfato em valores de pH 6,0 e 7,0, o melhor coeficiente de partição foi obtido com o PEG 600 e PEG 6000 ($K_{AC} \sim 15,5$).

Silva *et al.* (2009b) estudaram a otimização da extração de ácido clavulânico usando SDFA. Os autores utilizaram um modelo experimental que permitiu avaliar a

influência dos parâmetros pH e massa molar do PEG no coeficiente de distribuição, fator de purificação e rendimento, para que fosse possível otimizar o processo, e determinar assim as melhores condições de purificação. Para a extração do ácido clavulânico do caldo de fermentação por SDFA, o melhor rendimento ficou entre 90 - 100% e o fator de purificação entre 1,5 - 2,0, em um sistema de PEG 400 e pH 6,4. Estes resultados indicaram que o SFDA é uma alternativa viável para a purificação do ácido clavulânico, podendo ser integrado a outras operações de purificação como ultrafiltração, cromatografia de troca iônica ou mesmo reações de precipitação.

Dessa forma, verifica-se que os processos de extração com solvente orgânico seguido de métodos cromatográficos têm sido até hoje os mais utilizados para a purificação do ácido clavulânico. Portanto, a busca por alternativas mais econômicas, simplificadas, ecológicas é de grande interesse.

2.2 Extração líquido-líquido em duas fases aquosas

Os processos de separação e purificação não apresentaram o mesmo grau de desenvolvimento nos últimos anos, quando comparados aos processos fermentativos. Os processos de separação e purificação de produtos biofarmacêuticos existentes são constituídos, na sua maioria, de várias etapas com baixos rendimentos, o que eleva o custo agregado destes produtos. Dessa forma, os avanços na indústria de biotecnologia centram-se num importante pré-requisito, o desenvolvimento de técnicas e métodos para a separação de biomoléculas economicamente viáveis, que atinjam elevados graus de rendimento e pureza e que preservem as propriedades biológicas das moléculas de interesse (COSTA *et al.*, 2000). Neste contexto, a extração líquido - líquido em duas fases aquosas consiste em alternativa às técnicas de purificação convencionalmente empregadas.

A extração líquido - líquido é 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 empregando-se solventes orgânicos é amplamente utilizada na purificação de diferentes substâncias, inclusive antibióticos. Nos últimos anos vem se ampliando a utilização de métodos de extração líquido - líquido em sistemas aquosos para extração de moléculas, sejam estas biologicamente ativas ou não.

Dentre os diferentes tipos de extração líquido-líquido utilizando os Sistemas de Duas Fases Aquosas (SDFA), estão os Sistemas Poliméricos de Duas Fases Aquosas (SPDFA) e os Sistemas Micelares de Duas Fases Aquosas (SMDFA), sendo o primeiro constituído por polímeros hidrofílicos ou por polímero e sal e o segundo constituído primariamente por moléculas de tensoativos, que tendem a formar micelas, e oferecem simultaneamente ambientes hidrofóbico e hidrofílico, permitindo assim que biomoléculas possam ser purificadas em decorrência da partição diferencial (seletividade na partição) da molécula-alvo e impurezas. O elevado teor de água nas duas fases de um SDFA, de 60 a 90% em massa favorece a manutenção das propriedades biológicas das biomoléculas de interesse durante a separação quando comparado com sistemas de duas fases empregando solvente orgânico (XIE *et al.*, 2006).

Diversas vantagens têm contribuído para o crescente interesse nos SDFA, podendo-se destacar a facilidade de ampliação de escala, elevados rendimentos, proporcionam ambientes amenos para materiais biológicos (possibilidade de operação à temperatura ambiente), etc. (ALBERTSSON, 1986). Esses sistemas possuem grande potencial para a extração de proteínas, de pequenos materiais particulados (extração direta do meio fermentado) e para a obtenção de grandes volumes em modos de operação contínuos (tempo de contato curto) (PORTO, 2008).

Particularmente, os sistemas micelares de duas fases aquosas (SMDFA) apresentam uma série de características únicas e desejáveis quando comparados aos sistemas poliméricos de duas fases aquosas. As micelas, por serem susceptíveis a modificações em sua estrutura, possibilitam o controle e aprimoramento da partição de biomoléculas pelo ajuste das suas características como tamanho e forma através da variação da temperatura, concentração do tensoativo e adição de sais. (LIU *et al.*, 1996). A partição 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; SU, 1999; SAITON; HINZE, 1995; SIVARS; TJERNELD, 2000). A separação do produto das moléculas de tensoativo após a purificação pode ser facilitada pelo fato das micelas serem auto associativas (ou coloides de agregação). Por exemplo, o produto pode ser separado dos monômeros por ultrafiltração (LIU *et al.*, 1995).

Considerável interesse tem sido verificado na utilização dos SMDFA para purificar e concentrar diferentes compostos, tais como albumina de soro bovino (SILVA; ARRUDA, 2009), metais (DURUKAN *et al.*, 2011; MOHAMMAD *et al.*, 2011; ULUSOY *et al.*, 2011; YILDIZ *et al.*, 2011; REFFAS *et al.*, 2010; DIDI *et al.*, 2011; CITAK; TUZEN, 2010), enzimas (RANGEL-YAGUI *et al.*, 2003; BESEL; BAKIR, 2003), citocromo P450 e *b5* (TANI *et al.*, 1997; TANI *et al.*, 1998), proteínas (JOZALA *et al.*, 2008; XIE *et al.*, 2006; LOPES *et al.*, 2010; MA *et al.*, 2012), antibióticos (SANTOS *et al.*, 2011; ANDRADE *et al.*, 2011), anticorpos (ALCARAZ *et al.*, 1984), nanopartículas (MUSTAFINA *et al.*, 2011; NAZAR *et al.*, 2011), corantes (PURKAIT *et al.*, 2006; HADDOU *et al.*, 2011; ZHONG, *et al.*, 2011; POUREZZA *et al.*, 2011) e compostos orgânicos (ZHOU *et al.*, 2009; WANG *et al.*, 2012).

2.2.1 Sistemas Micelares de Duas Fases Aquosas (SMDFA)

Conforme mencionado anteriormente, os SMDFA são constituídos primariamente por agentes tensoativos em solução aquosa, sendo que agentes tensoativos são moléculas anfifílicas que apresentam duas regiões distintas: uma porção hidrofílica ou polar, comumente denominada “cabeça polar” e uma porção hidrofóbica ou apolar, comumente denominada “cauda apolar”. Os tensoativos podem ser classificados em três classes gerais: (i) iônicos (catiônicos ou aniônicos), (ii) não iônicos, e (iii) zwitteriônicos (Israelachvili, 1992). Bis (2-etilhexil) sulfosuccinato de sódio (AOT), brometo de cetiltrimetil amônio (CTAB), polioxietileno p-t-octil fenol (TritonTM X-114) e dioctanoilfosfatidilcolina (C₈-lecitina) são exemplos de tensoativos aniônico, catiônico, não iônico e zwitteriônico, respectivamente. A Figura 7 apresenta as fórmulas químicas dos tensoativos TritonTM X-114 e TritonTM X-100 (doravante denominados Triton X-114 e Triton X-100).

FIGURA 7 - Estrutura química dos tensoativos não iônicos, derivados dos alquilfenóis etoxilados (Triton X-114 e Triton X-100).

Em função dessa estrutura química diferenciada (molécula anfifílica), quando em contato com a água, as moléculas dos tensoativos tendem a se organizar de maneira que a região hidrofílica polar maximize sua interação com a água e a região hidrofóbica evite o contato com este solvente. Estas interações podem levar à formação de diversos tipos de agregados nanométricos em solução aquosa. Neste sentido, em soluções com concentrações de tensoativo superiores à Concentração Micelar Crítica (CMC), as moléculas de tensoativo formam agregados dinâmicos conhecidos como micelas, nos quais as caudas hidrofóbicas se associam no interior minimizando o contato com a água e as cabeças polares permanecem na superfície externa da micela maximizando seu contato com a água (CHEVALIER; ZEMB, 1990). A CMC depende da estrutura do tensoativo (tamanho da cadeia do hidrocarboneto e da parte polar do monômero) e das condições experimentais (força iônica, temperatura, pH, solvente, etc) (TANFORD, 1980). Para os tensoativos Triton X-114 e Triton X-100 os valores de CMC são 0,17 mM e 0,31 mM, respectivamente (SIVARS; TJERNELD, 2000).

As micelas são termodinamicamente estáveis, facilmente reproduzíveis e estão continua e reversivelmente trocando monômeros umas com as outras, e portanto, denominadas **coloides de associação** (Figura 8). Podem ser constituídas de dezenas a milhares de monômeros de agentes tensoativos (PUVVADA; BLANKSTEIN, 1990).

FIGURA 8 - Ilustração esquemática do equilíbrio termodinâmico reversível monômero-micela (baseado em Liu *et al.*, 1996).

O processo de formação das micelas, denominado micelização, é governado primariamente pelo ganho de entropia associado à força motriz do processo de internalização da cadeia hidrofóbica no núcleo micelar, sendo a razão principal para a formação de micelas a obtenção de um estado mínimo de energia livre. O ganho de entropia nesse processo pode ser explicado pela presença das moléculas de tensoativo em um solvente aquoso, que faz com que a porção hidrofóbica dos monômero provoquem distorções na estrutura líquida do solvente, aumentando a energia livre do sistema. A diminuição da energia do sistema pode ser ocasionada ou pela migração dos monômeros para a superfície (seus grupamentos hidrofóbicos são orientados para fora do solvente) ou pela formação dos agregados micelares, já que a porção hidrofóbica está internalizada e a distorção na estrutura do solvente esta diminuída (energia livre da solução reduzida). Outra explicação para a diminuição da energia livre enfatiza o aumento da liberdade da cadeia hidrofóbica no interior apolar da micela, em relação ao ambiente aquoso, no qual têm sido sugerido que este aumento da mobilidade das cadeias de hidrocarboneto e, é claro, suas atrações mútuas constituem o principal fator hidrofóbico na micelização (ATTWOOD; FLORENCE, 2003). A formação de micelas reflete um balanço complexo de várias forças intermoleculares, incluindo interações de Van der Waals, eletrostáticas, estéricas, hidrofóbicas e ligações de hidrogênio (TANFORD, 1980; ISRAELACHVILI, 1992).

Para determinados tensoativos iônicos e não iônicos, uma solução micelar isotrópica, homogênea submetida a determinadas condições como aumento de temperatura e adição de sais, pode espontaneamente se separar em duas fases líquidas aquosas e imiscíveis (Figura 9). 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).

FIGURA 9 - Representação esquemática de um sistema micelar de duas fases aquosa para um tensoativo não iônico alquilfenol etoxilado. O sistema exibe uma única fase a baixas temperaturas, e com o aumento da temperatura se separa em uma fase rica em micelas (fase inferior) coexistindo com uma fase pobre em micelas (fase superior).

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 diminuição 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). Certos tensoativos não iônicos, como Triton X-114 e Triton X-100, apresentam o fenômeno de separação de fases induzido por aumento de temperatura (MITCHELL, 1983). Consequentemente, a curva de coexistência possui concavidade voltada para cima e o sistema exibe um ponto crítico inferior (Figura 10).

FIGURA 10 - Representação da curva binodal para um sistema formado por tensoativo não iônico alquilfenol etoxilado/tampão. **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, **C_0**) 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, **C_0**) 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 ($T_{névoa}$) e seu valor depende da estrutura e concentração do tensoativo e presença de aditivos. O ponto de névoa para tensoativos da classe dos alquilfenóis etoxilados aumenta com o aumento relativo do tamanho da cadeia de polióxido de etileno e diminui com o aumento da cauda hidrofóbica, como ocorre com o Triton X-100 que possui um ponto de névoa maior ($T_{névoa} = 65\text{ }^{\circ}\text{C}$) quando comparado ao Triton X-114 ($T_{névoa} = 22\text{ }^{\circ}\text{C}$) (SIVARS; TJERNELD, 2000). Aditivos modificam as interações entre o tensoativo e a água e, conseqüentemente, podem alterar a CMC, o tamanho das micelas, o ponto de névoa e o comportamento da fase concentrada ou rica em micelas (JAN *et al.*, 2007). A adição de sais, por exemplo, geralmente resulta em interações eletrostáticas com as moléculas de água mais fortes que as ligações de hidrogênio entre a cabeça polar dos tensoativos e a água. Com isso, as moléculas de água são direcionadas preferencialmente para a solvatação dos íons provenientes do sal e as moléculas anfífilas interagem e se agregam mais entre si do que na ausência do sal, sendo este efeito é conhecido

como *salting-out*. Os íons podem ser classificados quanto à sua atuação na estrutura da água em: cosmotrópicos, isto é, promovem uma interação mais forte com a água; e caotrópicos, que promovem uma interação mais fraca com as moléculas de água (Figura 11) (COLLINS; WASHABAUGH, 1985). Assim, para tensoativos derivados de polióxido de etileno a separação de fases ocorre em temperaturas mais baixas, na presença de sais cosmotrópicos, devido à diminuição do ponto de névoa (ZOURAB *et al.*, 1991; CARALE, 1993).

FIGURA 11 – Classificação dos íons em relação à interação com a molécula de água.

Na presença de pequenas quantidades de tensoativos iônicos (aniônicos ou catiônicos), os valores de ponto de névoa para soluções de um tensoativo não iônico podem aumentar devido à formação de micelas mistas, parcialmente carregadas. Desta maneira, a repulsão micela-micela aumenta 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; GALERA-GOMEZ, 1995; NASCENTES; ARRUDA, 2003).

Em SMDFA, biomoléculas podem ser separadas dependendo principalmente das suas características hidrofóbicas e hidrofílicas. O trabalho pioneiro que mostrou a possibilidade de extração de proteínas por sistemas micelares, utilizando-se o tensoativo Triton X-114, foi o de Bordier, em 1981. O trabalho desse autor mostrou que as proteínas hidrofílicas eram encontradas predominantemente na fase pobre em micelas enquanto proteínas com caráter hidrofóbico se encontravam na fase rica em micelas. Posteriormente, estudos demonstraram que a partição de proteínas

hidrofílicas é altamente afetada pela adição de tensoativos iônicos em sistemas de duas fases tensoativo/polímero (SIVARS *et al.*, 1996).

Alcaraz *et al.* (1984) estudaram a distribuição do receptor de imunoglobulina E (IgE) e suas subunidades em solução de Triton X-114. Os IgE e IgE complexado com o seu receptor intacto ou com a cadeia α do receptor, são principalmente particionados para a fase pobre em micelas, devido ao seu caráter hidrofílico, com valores de recuperação em torno de 90%, enquanto que o receptor não ligado, a cadeia α isolada, especialmente as cadeias β e γ do receptor e o complexo $\alpha\beta\gamma_2$ possuem uma superfície mais hidrofóbica, com partição preferencial para a fase rica em tensoativo. Tani *et al.* (1998) estudaram a extração do citocromo *b5* em sistemas micelares formado por 2% (m/v) Triton X-114 e dois polímeros diferentes: dextrana com carga positiva (DEAE-Dx) e sulfato de dextrana (Dx-S), de carga negativa. Inicialmente, ao se utilizar o polímero catiônico foi verificada uma recuperação da molécula na fase micelar, em torno de 80%, entretanto, com 60% de remoção das proteínas nesta mesma fase, isto é, rica em micelas. Com a adição do polímero Dx-S não houve uma alteração na recuperação da molécula, quando comparado ao polímero catiônico, entretanto, verificou-se uma redução das proteínas contaminantes de 60% para 20%, indicando uma preferência das proteínas para a fase oposta, neste caso, rica em polímero (Dx-S).

Silva e Arruda (2009) propuseram um sistema formado pelo Triton X-114 e o dodecilsulfato de sódio (SDS) para a extração da albumina presente no plasma sanguíneo. Observou-se que devido às características hidrofílicas da albumina, bem como à dimensão dos agregados formados, a extração da proteína para a fase rica em tensoativo apresentou valores de coeficiente de partição que não ultrapassaram $K_{alb.} = 0,66$, representando uma eficiência na extração em torno de 40%. Foi verificado um aumento significativo no coeficiente de partição ($K_{alb.} = 0,10 \pm 0,09$ para $2,80 \pm 0,7$) quando o pH do sistema permaneceu próximo ao ponto isoelétrico da proteína (pH 5,0), sendo que neste pH, a solubilidade da albumina está reduzida, o que pode ter favorecido a migração para a fase rica em micelas. A adição do sal KH_2PO_4 promoveu um aumento no valor do $K_{alb.}$ de $2,80 \pm 0,7$ para $9,20 \pm 0,5$, com uma eficiência de extração em torno de 95%, devido à características cosmotrópicas do sal, que reduziu a neutralização das cargas do SDS, favorecendo interações eletrostáticas entre as micelas e as moléculas proteicas.

Zeng e Asare (2004) investigaram a partição de sílica (SiO_2) em Triton X-100 com o polímero dextrana. Foi verificado que neste sistema a partição da sílica é altamente dependente do pH. As partículas apresentaram partição preferencial para a fase rica em tensoativo em $\text{pH} < 3,5$, entretanto, o rendimento nesta fase diminuiu com o aumento do pH. Este comportamento foi atribuído à força de interação entre o tensoativo e a partícula (ligação de hidrogênio), que é dependente do pH. Em $\text{pH} > 11$, as partículas migraram para a fase rica em tensoativo novamente, devido ao pico de acidez do polímero que causa repulsão eletrostática entre o polímero e as partículas, repelindo-as para esta fase. A adição de tensoativos iônicos como o SDS (aniônico) e o brometo de dodeciltrimetilamônio - DTAB (catiônico) influenciaram a partição da sílica. Com a presença do tensoativo aniônico, as partículas migraram para a interface ou a fase rica em polímero, pela repulsão eletrostática. No caso do DTAB, as partículas tiveram uma partição preferencial para a fase rica em tensoativo (neste caso, micelas mistas), devido à atração eletrostática entre as cargas do sistema.

Outros autores reportaram processos de extração de bacteriocinas em sistemas formados pelo Triton X-114. Um novo procedimento combinando Triton X-114 com cromatografia de troca iônica foi desenvolvido para purificar a bacteriocina pediocina do meio de cultura de *Carnobacterium divergens* (METIVIER *et al.*, 2000). Estes autores verificaram que a pediocina era recuperada na fase rica em tensoativo, enquanto outras substâncias (componentes do meio fermentado e metabólitos celular) foram recuperadas na fase pobre em tensoativo. Foi verificado que a separação de fases foi altamente seletiva não somente para a bacteriocina, sendo que apenas 0 - 1% das proteínas presente no meio de cultura migrou para a fase rica em tensoativo. Após a cromatografia de troca iônica, realizada com a fase rica em tensoativo, 95% de pureza da bacteriocina ativa foi obtida, com total remoção do tensoativo, obtendo valores próximos a 100%. Jozala *et al.* (2008) estudaram a extração da bacteriocina nisina comercial e produzida pelo micro-organismo *Lactobacillus sake*, neste mesmo sistema. Os resultados indicaram a preferência da nisina (comercial e produzida) em migrar para a fase rica em tensoativo ($K_{\text{nisina}} > 2,0$), provavelmente devido à sua característica molecular hidrofóbica. O balanço da atividade antimicrobiana da nisina, após o processo de extração, forneceu resultados $> 95\%$, demonstrando que o sistema é ameno a bacteriocina, que por sua vez, é estável frente ao Triton X-114/tampão.

Um estudo da remoção da endotoxina LPS (lipopolissacarídeo) em sistema de Triton X-114 foi realizado por Lopes *et al.* (2010). Estes autores avaliaram o uso do SMDFA para a remoção da endotoxina de preparações contendo proteínas recombinantes, como a proteína verde fluorescente (GFP). Os ensaios de partição foram realizados com o LPS puro e na presença de lisado celular de *Escherichia coli*. De acordo com os resultados, o sistema estudado provou ser efetivo na recuperação da GFP, que migrou preferencialmente para a fase pobre em tensoativo ($K_{GFP} < 1,00$), com remoção do LPS na fase rica em tensoativo ($\%R_{LPS} > 98,0\%$). Ma *et al.* (2012) investigaram um processo de extração isotérmico formado pelos tensoativos Triton X-114 e SDS na presença de NaCl, para a remoção de endotoxinas contaminantes (afinidade pela fase micelar) presentes em preparações de plasmídeos. Estes autores verificaram que o processo de extração proposto apresentou um leve aumento na eficiência ($Rec_{plasmídeo} = 87,6 \pm 3,8\%$) de recuperação na fase aquosa, quando comparado ao processo convencional, realizado por temperatura de transição ($Rec_{plasmídeo} = 79,7 \pm 2,6\%$), com valores inferiores a 0,1 unidades de endotoxinas (UE)/6 μ g DNA, nas amostras de plasmídeos.

Pourreza *et al.* (2011) avaliaram o sistema misto formado pelos tensoativos CTAB, Triton X-114 e Triton X-100, com adição do sal KCl, para a extração do corante vermelho de allura presente em alimentos, como doces, refrigerantes e geléias. A recuperação do corante na fase rica em micelas, para todos os tipos de alimentos estudados, apresentou valores próximos a 100%, promovendo uma eficiente separação. O limite de detecção (LD) deste método foi menor ($LD = 7,8$ g/L) quando comparado a outras técnicas de purificação como cromatografia líquida de alta eficiência – HPLC (do inglês *High Performance Liquid Chromatography*) ($LD = 32,0$ g/L), Eletroforese Capilar ($LD = 21,0$ g/L) e Polarografia de Pulso Diferencial ($LD = 43,0$ g/L). Outros pesquisadores estudaram o sistema formado pelo Triton X-114 para determinação de formaldeído em cerveja, com posterior análise por HPLC. A recuperação obtida por este método proposto apresentou valores muito próximos quando comparado à purificação do formaldeído apenas por HPLC (método padrão), sem extração prévia por SMDFA, sendo que as variações dos valores de recuperação foram de 92,3 - 100,8% e 88,4 - 98,0% para o método proposto e o método padrão, respectivamente. Entretanto, o tempo de preparação da amostra no sistema estudado foi reduzido quase 3 vezes e o limite de quantificação foi bem

menor (2,0 ng/mL) quando comparado ao método padrão (50 ng/mL), o que indica ser o método proposto, uma técnica sensível e rápida (WANG *et al.*, 2012).

Kukusamude *et al.* (2010) analisaram o sistema micelar misto formado pelos tensoativos CTAB e Triton X-114 para a extração de antibióticos penicilínicos (como a ampicilina, penicilina G, oxacilina e cloxacilina) em amostras de leite bovino, com subsequente análise por HPLC. O método teve um excelente potencial para a determinação destes compostos no leite, sendo de 15 - 40 vezes maior quando comparado ao método convencional (apenas HPLC), com recuperação acima dos 80% e limites de detecção de 2 - 3 ng/mL.

Purkait *et al.* (2006) estudaram o comportamento da crisoidina em sistemas com Triton X-100 e Triton X-114. Foi verificado que a eficiência da extração aumentou com a temperatura e concentração de tensoativo e sal, em pH 9,0 (pH ideal para a solubilização do corante na fase rica em tensoativo). No sistema 0,25 M Triton X-100, a extração da crisoidina aumentou de 93 para 97,5% com o aumento da temperatura (de 75 para 90 °C), sendo que para o sistema com 0,075 M de Triton X-114, houve um aumento de 96 para 98% quando a temperatura foi de 40 para 55°C. A extração de crisoidina teve um aumento (2 - 3%) na presença do cloreto de cálcio quando comparado ao cloreto de sódio (em ambos os tensoativos), sendo 0,3 M a melhor concentração de sal estudada. Haddou *et al.* (2011) estudaram a extração de corantes azóicos, o alaranjado II e alaranjado G em tensoativos não iônicos Oxo-C_nE_n e Triton X-100. Em ambos os tensoativos, foi obtido um rendimento em torno de 99% para o corante alaranjado II, em um sistema com 5% de tensoativo a 51 °C. O alaranjado G possui uma solubilidade menor quando comparada ao alaranjado II e, portanto sua extração dos efluentes é mais dificultada, sendo que a redução da concentração deste corante no efluente não foi maior que 4,5 e 2,5 vezes ao se utilizar Triton X-100 e Oxo-C_nE_n, respectivamente. A adição de 0,025% do tensoativo catiônico CTAB no sistema 8% Oxo-C_nE_n levou a um aumento na extração do alaranjado G de 55 para 98%, sendo a concentração deste corante nos efluentes reduzida quase 400 vezes.

A purificação e extração de nanopartículas inorgânicas (NPs) também vêm sendo estudada por diversos autores. Nazar *et al.* (2011) estudaram a extração de NPs de ouro e paládio em Triton X-114/Triton X-100. Entre todos os sistemas estudados o que apresentou uma melhor extração de ambas as nanopartículas (~ 51%) foi o sistema constituído por 80% de Triton X-114 + 20% Triton X-100. Com o

aumento da concentração do Triton X-100 foi verificado uma menor eficiência na extração das NPs o que pode estar atribuído ao aumento do volume e da viscosidade da fase concentrada em micelas, que acarreta em uma menor sensibilidade do sistema. Quando a fase concentrada em micelas foi redispersa em 0,4 mL de metanol 50% (v/v), foi obtida uma recuperação de 35% das NPs pura, sendo verificado por microscopia eletrônica que não houve alteração na estrutura e estabilidade das nanopartículas após o processo de extração. Mustafina *et al.* (2011) investigaram a extração de nanopartículas de sílica em Triton X-100. Estes autores verificaram que com o aumento da concentração do tensoativo (0,03 mM para 5 mM) houve um acréscimo na extração de $\pm 20\%$ para $\pm 40\%$. Entretanto, com a adição do tampão Tris (25 mM - pH 7,2) ocorreu um aumento na extração de 20% para 95%, atribuído a presença do sal e ao pH 7,2, que acarretou em ligações de hidrogênio entre os grupos Si-OH da sílica e as cadeias de polioxido de etileno do tensoativo.

Vários estudos têm mostrado a ampla utilização dos sistemas formados por Triton X-114 e Triton X-100 para a extração de metais. Reffas *et al.* (2010) estudaram a extração de cobre em sistema Triton X-100/Na₂SO₄ com a utilização de um agente extrator de caráter básico, o *n,n'*-bis(salicilidenoaminoetil)amina. O processo de extração foi baseado na formação de um complexo entre o metal e o agente extrator, que devido à sua hidrofobicidade, permitiu 100% de eficiência na extração do complexo na fase rica em tensoativo, em um sistema com 5% (p/p) tensoativo, 0,002 M agente extrator, 0,49 M Na₂SO₄ em pH 9,0 a 65 °C. Outros autores investigaram a extração de alumínio e crômio (IV), baseado na formação de um complexo entre o metal e agentes quelantes, como o sal de diazônio (para a extração de alumínio) e o dietilditiocarbamida (para a extração de crômio), em um sistema de Triton X-114 e Triton X-100. Em ambos os estudos, a presença do metal complexado, na fase rica em tensoativo foi analisada por Espectrometria de Absorção Atômica. Na extração de alumínio e crômio (IV), as melhores condições obtidas forneceram um limite de detecção de 1,43 µg/L, desvio padrão de 2,7% com um fator de enriquecimento de 50 e um limite de detecção de 0,08 µg/L, desvio padrão de 1,2% com um fator de enriquecimento de 98, respectivamente (ULUSOY *et al.*, 2011; YILDIZ *et al.*, 2011). Nesta mesma linha, Mohammadi *et al.* (2010) e Durukan *et al.* (2011) estudaram a extração, em Triton X-114, de paládio, ouro e níquel (complexação com 1-(2-piridilazo)-2-naftol) e de ferro e cobre (complexação

com eriocromo cianina R), respectivamente. Os melhores resultados obtidos forneceram limites de detecção de 3,4, 3,9 e 2,4 $\mu\text{g/mL}$ com desvios padrões de 1,5, 1,3 e 1,8% para paládio, ouro e níquel, respectivamente, e limites de detecção de 0,33 e 0,57 ng/mL , com fatores de enriquecimento de 141 e 99, para o ferro e o cobre, respectivamente.

3. OBJETIVOS

Estudar a partição do ácido clavulânico puro empregando-se sistemas micelares de duas fases aquosas formados pelos tensoativos Triton X-100 ou Triton X-114, bem como a influência da adição de sais e polímeros, como o sulfato de amônio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e sulfato de dextrana (Dx-S), respectivamente, no coeficiente de partição desta molécula. Para que o objetivo proposto fosse alcançado, os seguintes objetivos específicos foram estabelecidos e cumpridos:

- ✓ Determinar os parâmetros de estabilidade: Estudo da estabilidade do ácido clavulânico em função da concentração dos tensoativos e aditivos, tempo, pH e temperatura;
- ✓ Construir diagramas de fases para os tensoativos Triton X-114 e Triton X-100/tampão e na presença de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ou sulfato de dextrana (Dx-S);
- ✓ Estudar a partição do ácido clavulânico em sistemas micelares: Triton X-114/tampão e Triton X-100/tampão: Influência da temperatura e, conseqüentemente, do efeito de exclusão pelo volume;
- ✓ Estudar a partição do ácido clavulânico em sistemas micelares: Triton X-114/ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e Triton X-100/ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$;
- ✓ Estudar a partição do ácido clavulânico em sistemas micela/polímero: Triton X-114/Dx-S e Triton X-100/Dx-S.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

Os tensoativos não iônicos Triton X-114 e Triton X-100 e o sulfato de dextrana (Figura 12) de massa molecular 500.000 Da foram obtidos da 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, para realização da curva padrão) e grau farmacêutico da Galena (54% pureza).

FIGURA 12 – Estrutura química do polímero sulfato de dextrana (Dx-S).

Todos os outros reagentes utilizados foram de grau analítico. As soluções foram preparadas em tampão Mcllvaine consistindo de 20 mM de fosfato de sódio dibásico e 10 mM de ácido cítrico. Para os valores de pH, as concentrações dos sais que constituem o tampão foram ajustadas para um volume final de 200 mL, de acordo com a Tabela 1.

Tabela 1 - Relação dos volumes para o preparo da solução tampão Mcllvaine (MORITA; ASSUMPÇÃO, 2007).

pH	Na ₂ HPO ₄ 20 mM (mL)	Ácido cítrico 10 mM (mL)
2,0	0,4	19,6
4,0	7,71	12,29
6,5	13,85	6,15

Para o preparo de todas as soluções foi utilizada água ultrapura (condutividade: 18,2 mΩ a 25 °C) obtida do sistema de purificação Millipore Direct-Q UV.

4.2 Métodos

4.2.1 Determinação da concentração de ácido clavulânico

A concentração de ácido clavulânico foi determinada por meio de reação com imidazol (BIRD *et al.*, 1982), que se baseia na determinação de um composto oriundo da derivatização do ácido clavulânico com imidazol, o qual absorve em comprimento de onda de 312 nm (Anexo I). Nesta reação, o imidazol reage com o grupo carbonila do anel β-lactâmico rompendo a ligação C-N e formando uma nova ligação C-N entre o imidazol e o carbono do grupo carbonila. A quebra do anel β-lactâmico também leva à abertura do anel oxazolidínico com consequente descarboxilação (Figura 13). O produto desta reação (1-(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 no meio.

FIGURA 13 - Reação do ácido clavulânico com imidazol. (Adaptado de Bird *et al.*, 1982).

Foram preparadas duas soluções diferentes (A e B) em tubos de ensaio. A solução A é constituída de 0,25 mL da amostra e 1,25 mL da solução de imidazol (8,5 g em 100 mL - pH 6,8), sendo o branco composto por 1,25 mL da solução de imidazol e 0,25 mL de água, sendo que na presença do tensoativo, o branco da solução consistiu na preparação do sistema na ausência da biomolécula. Na solução B foram adicionados 1,25 mL de água a 0,25 mL da amostra, sendo o branco

constituído somente por água. A solução A foi colocada em banho a 30 °C por 15 minutos, e posteriormente resfriada à temperatura ambiente por 5 minutos. Subsequentemente, realizou-se a leitura da absorbância de ambas as soluções em espectrofotômetro Hitachi U-1900, e a concentração de ácido clavulânico foi expressa pela diferença da absorbância entre as soluções A e B.

4.2.2 Avaliação da estabilidade do ácido clavulânico em função da concentração de aditivos (sal e polímero), tempo, pH e temperatura

Em todos os ensaios de estabilidade foram preparadas, em tubos de ensaio, soluções contendo 30 mg/L de ácido clavulânico e tampão nas condições desejadas (pH 2, 4 e 6,5). As soluções foram homogeneizadas em agitador orbital (Blood Mixer, modelo MR-IV) a 8 rpm por 5 minutos à temperatura ambiente e colocadas em banho termorregulável (Nova Ética, 521/2D) nas temperaturas desejadas (5, 20, 35 e 45 °C) por 24 horas, em presença ou não de 0,4 M - 1,2 M de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ou 1,0 e 15,0% de sulfato de dextrana. Nos intervalos de tempos de 0, 2, 4, 6 e 24 horas, alíquotas foram retiradas e a concentração de ácido clavulânico remanescente foi determinada através da reação com imidazol. A porcentagem de ácido clavulânico presente na solução foi calculada de acordo com a equação:

$$Ac(\%) = \frac{Ac_{sol}}{Ac_{ini}} * 100 \quad (1)$$

Em que $Ac(\%)$ corresponde a porcentagem de ácido clavulânico que resistiu ao tratamento, Ac_{sol} à concentração de ácido clavulânico remanescente na solução, no respectivo intervalo de tempo, e Ac_{ini} é a concentração inicial de ácido clavulânico na solução estoque.

4.2.3 Avaliação da estabilidade do ácido clavulânico em função da concentração de Triton X-114 e Triton X-100

Antes de iniciar os estudos de extração e a partir dos resultados obtidos da estabilidade do ácido clavulânico em função da concentração de aditivos, tempo, pH

e temperatura, a estabilidade do fármaco frente aos tensoativos Triton X-114 e Triton X-100 no pH ideal foi estudada. Para isso, soluções contendo 30mg/L de ácido clavulânico foram preparadas em tubos de ensaio, com diferentes concentrações de tensoativos (0, 2, 4, 8 e 10% p/p) para cada sistema. Estes sistemas foram agitados em agitador orbital (Blood Mixer, modelo MR-IV) e incubados em banho termorregulável a 20 °C (Nova Ética, 521/2D). A concentração de ácido clavulânico nos sistemas foi determinada em diferentes intervalos de tempo: 0, 2, 4, 6 e 24 horas. A porcentagem de ácido clavulânico foi calculada de acordo com a equação 1.

4.2.4 Construção das curvas binodais para os tensoativos Triton X-114 e Triton X-100

As curvas binodais para os tensoativos Triton X-114 e Triton X-100 em tampão foram determinadas de acordo com o método do “ponto de névoa” (BLANKSCHTEIN *et al.*, 1986). Este método consiste em, visualmente, identificar a temperatura, $T_{névoa}$, na qual soluções com concentrações conhecidas de tensoativo tornam-se turvas à medida que se aumenta a temperatura. Inicialmente foram preparadas soluções contendo diferentes concentrações de tensoativos (0,5, 1,0, 3,0, 5,0, 7,0, 9,0 e 15,0% p/p) no pH ideal para a manutenção da estabilidade da biomolécula. Neste pH também foram construídas curvas binodais dos tensoativos em presença do sal sulfato de amônio e do polímero sulfato de dextrana, a fim de estudar a influência destes aditivos no “ponto de névoa”. Os componentes do sistema micelar foram adicionados em tubos de 10 mL por pesagem resultando em sistemas de massa total de 2g. A seguir, foram homogeneizados em agitador orbital (Blood Mixer, modelo MR-IV) a 8 rpm por 30 minutos (para altas concentrações do polímero ($\geq 8,0\%$ p/p) ou tensoativo ($\geq 9,0\%$ p/p), o tempo de agitação passou a ser 1,5 h). Os sistemas foram colocados em um banho transparente termorregulável (Nova Ética, 521/2D) a uma temperatura suficientemente baixa para que apresentassem uma fase, clara e homogênea. A partir desse ponto, a temperatura foi vagarosamente aumentada (de 0,1 em 0,1 °C) até que a solução se tornasse turva. A curva binodal foi obtida traçando-se os valores de $T_{névoa}$ em função das concentrações dos tensoativos. Esse procedimento foi realizado em triplicata para cada valor de

concentração e, portanto, o ponto de névoa foi definido como a média dos três valores de temperatura determinados.

4.2.5 Ensaios de partição em sistema micelar de duas fases aquosas

Os SMDFA (Figura 14) foram preparados em tubos de ensaio graduados de 10 mL, à temperatura ambiente, pela adição dos componentes desejados em cada ensaio (ácido clavulânico (30 mg/L), Triton X-114, Triton X-100, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e sulfato de dextrana) em tampão McIlvaine no pH desejável, resultando em um sistema de massa total de 5g. Os componentes do sistema micelar foram acrescentados por pesagem **(1)** e homogeneizados em agitador orbital **(2)** (Blood Mixer, modelo MR-IV) a 8 rpm por 30 min (para altas concentrações do polímero ($\geq 8,0\%$ p/p) ou tensoativo ($\geq 9,0\%$ p/p), o tempo de agitação passou a ser 1,5 h). Em seguida, os sistemas foram transferidos para um banho **(3)** de temperatura controlada com valor previamente ajustado ao desejado e mantido em repouso por 2 horas (para os sistemas puros ou na presença de sal) e 24 horas (para os sistemas na presença de polímero) para a separação das fases e equilíbrio das mesmas. Após o repouso, amostras das fases superior e inferior foram coletadas **(4)** cuidadosamente, utilizando-se seringa e agulha. A concentração de ácido clavulânico em cada uma das fases obtidas **(5)** foi determinada conforme descrito no item 4.2.1.

Figura 14 - Esquema do procedimento experimental para SMDFA.

4.2.6 Determinação da condutância elétrica das fases diluída e concentrada

A determinação da condutância elétrica da fase diluída (F_d) e concentrada (F_c) dos sistemas foi realizada a fim de verificar a distribuição do sal $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e do polímero sulfato de dextrana, bem como identificar uma possível inversão de fases. Os ensaios foram realizados em condutivímetro Oakton pH/Con 510, sendo a calibração feita com solução padrão Mettler Toledo (12,88 mS/cm), em temperatura ambiente.

4.2.7 Determinação da composição em massa das fases diluída e concentrada

A determinação da composição em massa (mg) dos tensoativos Triton X-1114 e Triton X-100 na fase diluída (F_d) e concentrada (F_c) dos sistemas estudados foi realizada a fim de se conhecer a composição das fases rica e pobre em micelas, bem como identificar uma possível inversão de fases do sistema. A composição (mg) das fases foi determinada através da curva padrão obtida para ambos os tensoativos (Anexo II e Anexo III), construída de acordo com a absorbância em diferentes concentrações de tensoativos (0,021 a 0,46 mg/mL), em espectrofotômetro UV-vis Hitachi U-1900, no comprimento de onda de 274nm).

4.2.8 Análise dos ensaios de partição

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

$$K_{AC} = \frac{C_c}{C_d} \quad (2)$$

Em que: C_c e C_d correspondem às concentrações de ácido clavulânico na fase rica em micelas (concentrada - c) e na fase pobre em micelas (diluída - d), respectivamente.

Os balanços de massa foram calculados de acordo com a expressão:

$$BM = \frac{C_c V_c + C_d V_d}{C_i V_i} \times 100\% \quad (3)$$

O rendimento da recuperação do ácido clavulânico nas fases diluída (Y_{clavd}) e concentrada (Y_{clavc}) em micelas foi calculado através da equação 4 e corresponde a um parâmetro importante para análise da viabilidade industrial do processo de extração.

$$Y_{clavd} = \frac{C_d V_d}{C_i V_i} \times 100\% \quad \text{e} \quad Y_{clavc} = \frac{C_c V_c}{C_i V_i} \times 100\% \quad (4)$$

Em que: C_c , C_d e C_i referem-se às concentrações do ácido clavulânico 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 rica em micelas (c), pobre em micelas (d) e da solução estoque inicialmente adicionada ao sistema, respectivamente.

Estatística

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

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Avaliação da estabilidade do ácido clavulânico em diferentes pHs e temperaturas

A estabilidade do ácido clavulânico em tampão Mcllvaine nos valores de pH 2,0, 4,0 e 6,5 e nas temperaturas de 5, 20, 35 e 45 °C em diferentes intervalos de tempo, ao longo de 24 horas, foi determinada e os resultados estão apresentados nas Figuras 15, 16 e 17. Os valores de pHs estudados foram escolhidos com base na fração ionizada e não ionizada do fármaco, levando-se em conta o pKa do ácido clavulânico entre 2,3 - 2,7 (VIDEIRA; AIRES-BARROS, 1994), sendo que valores acima de 6,5 não foram estudados, já que foi demonstrado por Bersanetti *et al.* (2005) que a estabilidade do ácido clavulânico é maior em pH entre 6,2 – 7,0 e que a degradação ocorre mais rapidamente em soluções básicas ($\leq 8,0$) do que em soluções ácidas. Embora estes estudos demonstrassem uma alta instabilidade do ácido clavulânico em meio ácido ($\text{pH} < 3,0$), resolvemos avaliar neste trabalho a estabilidade frente ao pH 2,0, uma vez que, este resultado poderia direcionar o grupo para futuros estudos da partição da biomolécula, em sua forma não dissociada, nos SMDFA.

Como pode ser observado, o ácido clavulânico demonstrou ser bastante instável frente ao pH 2,0 (Figura 15) com valores de recuperação $\leq 35\%$ em 24 horas de estudo. No mesmo tempo e temperatura de 5 °C, para os pHs 4,0 e 6,5, a porcentagem de recuperação de ácido clavulânico se manteve praticamente constante e superior a 98% (Figura 16 e 17).

FIGURA 15 - Concentração de ácido clavulânico em tampão Mcllvaine pH 2,0 a 5, 20 e 35 °C ao longo de 24 horas. As barras de erro correspondem a um intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos.

FIGURA 16 - Concentração de ácido clavulânico em tampão Mcllvaine pH 4,0 a 5, 20 e 35 °C ao longo de 24 horas. As barras de erro correspondem a um intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos.

FIGURA 17 - Concentração de ácido clavulânico em tampão McIlvaine pH 6,5 a 5, 20, 35 e 45 °C ao longo de 24 horas. As barras de erro correspondem a um intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos.

O ácido clavulânico apresentou velocidades maiores de degradação em meio ácido (pH 2,0) à temperaturas mais elevadas (Figura 15), como 20 e 35 °C, no qual em apenas 2 horas, observou-se 40 e 18% de ácido clavulânico remanescente, respectivamente, quando comparado à uma temperatura mais amena, como 5 °C, que apresentou porcentagem de ácido clavulânico em torno de 55%, no mesmo tempo estudado. Este perfil é notado também para os valores de pH 4,0 e 6,5, contudo, com uma menor queda na porcentagem de ácido clavulânico remanescente. Para o pH 4,0, após 24 horas, estava presente aproximadamente 72 e 25% de ácido clavulânico não degradado, nas temperaturas de 20 e 35 °C (Figura 16), respectivamente, enquanto que para o pH 6,5 observa-se uma maior estabilidade da biomolécula, com uma porcentagem do fármaco em torno de 85% a 20 °C e 65% a 35 e 45 °C (Figura 17). Portanto, nota-se a influência da temperatura na estabilidade da biomolécula, contudo menos acentuada do que o pH, ao se trabalhar em condições mais favoráveis (pH $\geq$ 4).

Os resultados encontrados estão de acordo com a literatura. Haginaka *et al.* (1981) em estudos de estabilidade do ácido clavulânico em solução aquosa a 35 °C a diferentes valores de pH (3,15 a 10,1) observaram que a taxa de degradação é altamente dependente do pH e que o valor para máxima estabilidade desta biomolécula seria próximo a 6,39, sendo mais estável à temperaturas menores. Pereira (2008) e Santos *et al.* (2009) verificaram que a maior estabilidade do

fármaco ocorre entre o pH 6,5 - 7,2, entretanto, com uma menor porcentagem residual do fármaco em pH 4,0 (< 20%) quando comparado ao pH 8,0 (> 30%) em uma temperatura elevada, em torno de 45 °C, no tempo de 6 horas. Nesta mesma linha, Méndez *et al.* (1992) estudaram a estabilidade de outros antibióticos β -lactâmicos, como a nocardicina A e o aztreonam e observaram o mesmo comportamento de degradação do ácido clavulânico. Estes autores verificaram que a degradação destes antibióticos monocíclicos segue uma cinética de pseudoprimeira ordem e é diretamente influenciada pelo pH do meio reacional, sendo que a máxima estabilidade foi obtida na faixa de pH entre 5,3 - 6,1. Foi observado também que a degradação ocorre mais rapidamente em solução básicas (pH = 8,8 e 10) do que em soluções ácidas (pH $\leq$ 4,0), com valores de porcentagem dos antibióticos remanescentes no meio, em torno de 30 e 90%, respectivamente.

Portanto, de acordo com estes resultados obtidos nos ensaios de estabilidade frente ao pH e temperatura, definiu-se o pH 6,5 a ser utilizado nos estudos subsequentes, frente a presença do sal, polímero e tensoativos Triton X-114 e Triton X-100.

5.2 Avaliação da estabilidade do ácido clavulânico em diferentes concentrações do $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

De acordo com os resultados de estabilidade frente ao pH e temperatura, os estudos subsequentes foram realizados em tampão McIlvaine pH 6,5, que como visto, é mais favorável para a manutenção da estabilidade do ácido clavulânico.

A estabilidade do ácido clavulânico não é apenas influenciada pelo pH e temperatura, mas também pela adição de sais de diferentes tipos, concentrações e força iônica. Este estudo foi realizado visando observar a influência de diferentes concentrações (0 - 1,2 M) do sal $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ na estabilidade do fármaco, frente às temperaturas de 5, 20 e 35 °C (Figura 18, 19 e 20), ao longo de 24 horas. O sal utilizado foi selecionado devido ao seu baixo valor comercial, alta solubilidade (~76g/100g H_2O a 20 °C), efeito cosmotrópico efetivo (redução da temperatura de $T_{\text{névoa}}$ dos tensoativos) (SILVA, 2008; REFFAS *et al.*, 2010), ampla utilização em precipitação e purificação de proteínas (DENNISON; LOURIEN, 1997; CHIARINI; PENNA, 2003; NIOI *et al.*, 2012; CHITHRA; DEVARAJ, 2012; DATSKEVICH *et al.*,

2012) e em sistemas de duas fases aquosas (LOPES, 2006; SILVA, 2008; AMID *et al.*, 2012; WU *et al.*, 2011; HEMAVATHI; RAGHAVAROA, 2011).

Observa-se pelos resultados a 5 °C (Figura 18), que nas 6 horas iniciais a estabilidade do ácido clavulânico na presença de diferentes concentrações do sal se manteve acima dos 95%.

FIGURA 18 - Concentração de ácido clavulânico em tampão McIlvaine pH 6,5 frente à diferentes concentrações do $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a 5 °C ao longo de 24 horas. As barras de erro correspondem a um intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos.

FIGURA 19 - Concentração de ácido clavulânico em tampão McIlvaine pH 6,5 frente à diferentes concentrações do $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a 20 °C ao longo de 24 horas. As barras de erro correspondem a um intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos.

FIGURA 20 - Concentração de ácido clavulânico em tampão McIlvaine pH 6,5 frente à diferentes concentrações do $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a 35 °C ao longo de 24 horas. As barras de erro correspondem a um intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos.

Semelhante ao observado na ausência de sal (item 5.1), nas temperaturas mais elevadas (20 e 35 °C), após 4 horas, houve uma maior perda da estabilidade do ácido clavulânico, sendo que a porcentagem residual está em torno de 90% a 20 °C (Figura 19) e 60% a 35 °C (Figura 20). Este resultado demonstra que o sal afetou a estabilidade do ácido clavulânico, uma vez que, em ausência do sal, a estabilidade da biomolécula após o mesmo período de tempo (4 horas) se manteve acima dos 98%, em todas as temperaturas estudadas.

Através destes resultados, foi possível verificar a menor estabilidade do ácido clavulânico na presença do $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, quando comparado à presença de outros sais como NaCl e Na_2SO_4 (Pereira *et al.*, 2008). De acordo com este autor, não foi verificada perda significativa do ácido clavulânico (aproximadamente 100%) frente às concentrações de 0,1 e 0,5 M destes sais nas temperaturas de 20 e 35 °C, em pH 6,5, após 3 horas de estudo. Porém observou-se uma perda da estabilidade da biomolécula em torno de 15% para o Na_2SO_4 e 5% para o NaCl, em 6 horas de estudo. Um estudo semelhante realizado por Santos *et al.* (2009), verificou que a maior perda da estabilidade do ácido clavulânico a 30 °C e pH 6,5, no tempo de 24 horas, está em torno de 15% e esta perda de estabilidade é atribuída ao sal MgSO_4 , devido ao aumento da força iônica no meio de 0,1 M para 0,5 M. Como observado na Figura 20, a porcentagem de perda da biomolécula degradada está em torno de 50% a 35 °C, cerca de 35% superior aos valores obtidos por estes autores, sendo

que a força iônica do meio contendo 0,4 M de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ é de 1,2 M e a força iônica do meio contendo 1,2 M de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ é de 3,6 M. Esta maior degradação do ácido clavulânico na presença deste sal pode ser devido à presença do íon amônio, oriundo da dissociação do sal. Neste sentido, Bersanetti *et al.* (2005) verificaram que as constantes de degradação do ácido clavulânico em soluções aquosas são menores ($k = 0,01672$ a $30\text{ }^\circ\text{C}$) em relação às soluções obtidas do meio de fermentação ($k = 0,04152$ a $30\text{ }^\circ\text{C}$), devido à presença de outros componentes do meio, tal como, compostos que contêm íon amônio, o qual por sua vez pode gerar amônia, capaz de atuar como nucleófilo e reagir com a carbonila do anel β -lactâmico do ácido clavulânico, degradando a molécula. Entretanto, verificou-se que o tempo necessário para a obtenção de um SMDFA em equilíbrio é relativamente curto, isto é, no máximo em 2 horas é possível obter um sistema com duas fases aquosas distintas, para ambos os tensoativos estudados, e, portanto, neste tempo a porcentagem do fármaco remanescente é superior a 85%.

Decorridas 24 horas, observa-se que não houve diferença (em torno de 5%) na estabilidade do ácido clavulânico em relação às diferentes concentrações de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ no pH 6,5. Portanto, para períodos de tempo mais longos verificou-se uma maior influência da temperatura e da presença do sal na estabilidade, independentemente da concentração de sal utilizada.

5.3 Avaliação da estabilidade do ácido clavulânico em diferentes concentrações do sulfato de dextrana

A estabilidade do ácido clavulânico também foi estudada frente à adição do polímero sulfato de dextrana (Dx-S), nas concentrações de 1,0 e 15,0%. Os ensaios foram realizados em tampão Mcllvaine no pH 6,5 e nas temperaturas de 5, 20 e 35°C em diferentes intervalos de tempo, ao longo de 24 horas, e os resultados estão apresentados nas Figuras 21, 22 e 23. O polímero utilizado foi selecionado devido ao seu caráter aniônico, com o objetivo de promover uma repulsão eletrostática do ácido clavulânico negativamente para a fase micelar e, assim, obter um aumento nos valores de K_{AC} , e também devido à sua ampla utilização em extração de proteínas (SILVÉRIO *et al.*, 2012; MADEIRA *et al.*, 2008; TANI *et al.*, 1998).

FIGURA 21- Concentração de ácido clavulânico em tampão McIlvaine pH 6,5 frente à diferentes concentrações de sulfato de dextrana (Dx-S) a 5 °C ao longo de 24 horas. As barras de erro correspondem a um intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos.

FIGURA 22 - Concentração de ácido clavulânico em tampão McIlvaine pH 6,5 frente à diferentes concentrações de sulfato de dextrana (Dx-S) a 20 °C ao longo de 24 horas. As barras de erro correspondem a um intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos.

FIGURA 23 – Concentração de ácido clavulânico em tampão McIlvaine pH 6,5 frente à diferentes concentrações de sulfato de dextrana (Dx-S) a 35 °C ao longo de 24 horas. As barras de erro correspondem a um intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos.

Como se pode verificar, na temperatura de 5 °C (Figura 21), os resultados da porcentagem de ácido clavulânico não degradado, tanto no tempo de 2 horas quanto em 24 horas, foram aproximadamente 100%, considerando-se o erro experimental. Com o aumento da temperatura, verificou-se que nas 6 horas iniciais de estudo, tanto a 20 °C (Figura 22) quanto a 35 °C (Figura 23), não houve grande variação da estabilidade da biomolécula, sendo que a porcentagem de ácido clavulânico não degradado nos sistema permaneceu acima dos 90%. Nas 24 horas de estudo, assim como nos ensaios na presença de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (item 5.2), houve uma maior perda da estabilidade do ácido clavulânico, contudo menos acentuada na presença do polímero. Em todas as condições estudadas a adição de polímero acarretou em menor perda da estabilidade do ácido clavulânico quando comparado à adição de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Pode-se verificar que na presença do sal, a porcentagem do ácido clavulânico residual está em torno de 40% a 20°C e 30% a 35°C, enquanto que na presença do polímero esta porcentagem está em torno de 80% a 20°C (Figura 22) e 60% a 35°C (Figura 23).

Semelhante ao observado nos estudos de estabilidade do ácido clavulânico frente ao $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, quando o fármaco foi exposto por um tempo mais longo ao sulfato de dextrana (24 horas), verificou-se que a concentração do polímero não influenciou a estabilidade do fármaco, mas sim a presença deste associado à temperatura.

Pereira *et al.* (2008) investigaram a estabilidade do ácido clavulânico frente aos polímeros polietilenoglicol (PEG) e poliacrilato de sódio (NaPA), na temperatura de 25 °C e em tampão Mcllvaine pH 6,8. Para o polímero PEG, nas concentrações 5 e 15% (p/p), os resultados da porcentagem de ácido clavulânico não degradado, tanto no tempo de 1 hora quanto para o de 3 horas, foram aproximadamente 100%, para todas as massas moleculares do polímero estudadas (2000, 4000 e 6000 Da). Em relação ao polímero poliacrilato de sódio, de massa molecular 8000 Da e em concentrações de 5 e 15% (p/p), a estabilidade da biomolécula permaneceu inalterada, apresentando também valores próximos a 100%. Portanto, os polímeros mostraram ser bastante amenos ao fármaco.

5.4 Avaliação da estabilidade do ácido clavulânico em diferentes concentrações Triton X-114 e Triton X-100

A partir dos estudos prévios de estabilidade do ácido clavulânico (item 5.1, 5.2 e 5.3), optou-se por continuar os estudos com o tampão Mcllvaine pH 6,5 a 20 °C, visando a estabilidade do fármaco e para que o sistema apresentasse-se monofásico. O estudo sobre a avaliação da estabilidade do ácido clavulânico na presença de diferentes concentrações de Triton X-114 (Figura 24) e Triton X-100 (Figura 25), mostrou que os resultados obtidos para 2, 4, 8 e 10% p/p dos tensoativos não apresentaram diferenças significativas entre si ao longo de 24 horas para o Triton X-114 e 6 horas para o Triton X-100. Na presença de ambos os tensoativos, a porcentagem de ácido clavulânico residual, não degradado, tanto no tempo de 2 horas quanto de 6 horas foi similar e aproximadamente 100%, considerando-se o erro experimental. Esta manutenção da estabilidade do ácido clavulânico no meio deve-se ao fato destes tensoativos não iônicos apresentarem baixo potencial de reatividade com o fármaco, mais especificamente com o grupo carbonila do anel β -lactâmico.

FIGURA 24 - Concentração de ácido clavulânico em tampão Mcllvaine pH 6,5 frente à diferentes concentrações de Triton X-114 a 20 °C ao longo de 24 horas. As barras de erro correspondem a um intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos.

FIGURA 25 - Concentração de ácido clavulânico em tampão Mcllvaine pH 6,5 frente à diferentes concentrações de Triton X-100 a 20 °C ao longo de 24 horas. As barras de erro correspondem a um intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos.

No tempo de 24 horas, observa-se uma ligeira queda na estabilidade para o Triton X-100, mais acentuada nas maiores concentrações do tensoativo (8 e 10% p/p), sendo a porcentagem de ácido clavulânico degradado em torno de 14% (Figura 25). Esta diferença na porcentagem de ácido clavulânico remanescente, entre ambos os tensoativos, pode estar relacionada com o fato da CMC do Triton X-114 ser menor (0,17 mM) quando comparada ao Triton X-100 (0,31 mM), e, portanto, a presença de quantidades menores de monômeros livres diminui a probabilidade de

reação via ataque da hidroxila terminal do tensoativo à carbonila do anel β -lactâmico do fármaco. Como pode ser observado, o fármaco apresentou-se bastante estável frente às concentrações de tensoativos analisadas. É importante ressaltar que nas menores concentrações do Triton X-114 houve instabilidade na leitura espectrofotométrica envolvida na quantificação do ácido clavulânico, devido à turvação do sistema, uma vez que, o ponto de névoa ($T_{\text{névoa}} \sim 25\text{ }^{\circ}\text{C}$) do tensoativo é próximo à temperatura ambiente e pode ter seu valor reduzido nas menores concentrações do tensoativo.

5.5 Curvas binodais do Triton X-114 e Triton X-100

5.2.1 Curvas binodais – Triton X-114/tampão e Triton X-100/tampão

Tendo em vista que a proposta deste trabalho consistiu no estudo da partição do ácido clavulânico em sistemas micelares puros e com a adição de sal ou polímero, as curvas binodais para os sistemas formados pelos tensoativos não iônicos Triton X-114/tampão (Figura 26) e Triton X-100/tampão (Figura 27), em tampão McIlvaine pH 6,5, foram determinadas. A curva binodal representa o limite, em função da temperatura e das concentrações de tensoativos, no qual, a solução micelar se separa em duas fases macroscópicas (NIKAS *et al.*, 1992), sendo essa temperatura conhecida como ponto de névoa ($T_{\text{névoa}}$) e seu valor depende da presença de sais, alcoóis, tensoativos iônicos e alguns compostos orgânicos (ZULAUF; MITCHEL, 1991; YAMAZAKI *et al.*, 1991). Através da curva binodal, é possível conhecer previamente os volumes e as concentrações da fase concentrada e diluída em micelas de um sistema, em determinada concentração inicial de tensoativo (% p/p) e temperatura, o que permite melhor compreensão do sistema formado, e, portanto, auxilia no planejamento dos ensaios de partição.

As curvas binodais obtidas para os tensoativos Triton X-114 e Triton X-100 mostraram-se coerentes e estão de acordo com as descritas na literatura (LOPES, 2006; XIE *et al.*, 2006; KABIR-UD-DIN *et al.*, 2008; JOZALA *et al.*, 2008; ZHOU *et al.*, 2009; SANTOS *et al.*, 2009).

FIGURA 26 – Curva binodal para o tensoativo Triton X-114 em tampão McIlvaine pH 6,5. As barras de erro correspondem a um intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos.

FIGURA 27 – Curva binodal para o tensoativo Triton X-100 em tampão McIlvaine pH 6,5. As barras de erro correspondem a um intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos.

Verifica-se que o ponto de névoa para estes tensoativos da classe dos derivados dos alquilfenóis etoxilados aumentou com o aumento relativo do tamanho

da cadeia de óxido de etileno, sendo que, o Triton X-100 possui uma maior cadeia, entre 9 - 10 unidades de óxido de etileno, e, portanto, uma temperatura de ponto de névoa maior, em torno de 63 °C, quando comparado ao Triton X-114, que possui 7 - 8 unidades de óxido de etileno e $T_{\text{névoa}}$ em torno de 25 °C. Este fenômeno também foi demonstrado por outros autores, como Zhou *et al.* (2009), que estudaram a composição dos sistemas formados pelos tensoativos Triton X-114 e Triton X-100 para a extração de pesticidas e verificaram um ponto de névoa maior para o tensoativo Triton X-100 ($T_{\text{névoa}} = 100$ °C) quando comparado ao Triton X-114 ($T_{\text{névoa}} = 30$ °C), no intervalo de concentração do tensoativo de 0,25 – 10% (m/v).

Nazar *et al.* (2011) estudaram o comportamento da curva binodal de um sistema misto formado pelo Triton X-114 e Triton X-100 para a extração de nanopartículas, e verificaram a formação de uma curva binodal com concavidade para cima, no qual a separação de fases ocorreu na temperatura de ponto de névoa próximo a 30 °C, em um sistema com concentração total de tensoativos a 1,0%. Mehling *et al.* (2012) avaliaram a formação de um diagrama de fases para o tensoativo Triton X-100, e verificaram que na concentração do ponto crítico (5%), a temperatura de névoa foi em torno de 70 °C, sendo o aumento da temperatura de $T_{\text{névoa}}$ relacionado com o aumento da concentração do tensoativo (10 - 60%), e, portanto, a curva de coexistência apresentou-se com concavidade voltada para cima.

5.5.2 Curvas binodais – Triton X-114/(NH₄)₂SO₄ e Triton X-100/(NH₄)₂SO₄

As curvas binodais para os sistemas formados pelo Triton X-114 e Triton X-100, na presença de diferentes concentrações do sulfato de amônio (NH₄)₂SO₄, em tampão McIlvaine pH 6,5, estão apresentadas nas Figuras 28 e 29. Sabe-se que a adição de eletrólitos, como sais e compostos orgânicos, pode contribuir não somente para a manutenção da estabilidade da biomolécula, por acarretar em uma diminuição significativa da temperatura de ponto de névoa dos tensoativos, mas também para um aumento na seletividade da partição das biomoléculas. O sal (NH₄)₂SO₄, devido ao seu caráter cosmotrópico, possui a característica de acarretar em diminuição do ponto de névoa, contribuindo para a redução do $T_{\text{névoa}}$ destes tensoativos. Tendo em vista a instabilidade do ácido clavulânico em altas

temperaturas e na tentativa de diminuir a temperatura de partição para o sistema micelar constituído pelo Triton X-100 que possui elevado $T_{\text{névoa}}$ (~ 65 °C), foram adicionadas maiores concentrações (0,4, 0,8 e 1,2 M) do sal sulfato de amônio neste sistema em comparação ao sistema Triton X-114/sal (0,25 M), que devido ao seu baixo $T_{\text{névoa}}$ (25 °C) não permitiu a adição de concentrações maiores do sal.

Pode-se observar que a adição de íons cosmotrópicos aos sistemas acarretou em uma queda do ponto de névoa, para ambos os tensoativos, atribuída ao efeito de *salting-out* destes eletrólitos, que resulta em alterações na estrutura de hidratação das cadeias de polióxido etileno nas micelas. Estes íons, sendo altamente hidratáveis, diminuem a concentração de moléculas de água na camada de hidratação formada ao redor da micela, permitindo assim maior interação micela-micela e, então, uma diminuição na temperatura do ponto de névoa ($T_{\text{névoa}}$). Sabe-se que em baixas concentrações ($\leq 0,1$ M) muitos eletrólitos não têm efeito significativo no ponto de névoa (GU; GALERA-GOMEZ, 1995), sendo o deslocamento da curva binodal relacionado à concentração destes eletrólitos e ao tipo de íon adicionado no sistema.

FIGURA 28 – Curvas binodais para o tensoativo Triton X-114 na presença e ausência de 0,25 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, em tampão McIlvaine pH 6,5. As barras de erro correspondem a um intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos.

Nota-se que a presença de 0,25 e 0,4 M do sulfato de amônio, para os sistemas Triton X-114/sal (Figura 28) e Triton X-100/sal (Figura 29), promoveu uma queda na temperatura em torno de 9 e 16 °C, respectivamente, sendo que para o Triton X-100, o aumento da concentração de sal para 0,8 e 1,2 M, promoveu queda do $T_{névoa}$ com valores próximos a 35 e 20 °C, respectivamente, em relação ao sistema na ausência do sal.

FIGURA 29 – Curvas binodais para o tensoativo Triton X-100 na ausência e presença de 0,4, 0,8 e 1,2 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, em tampão McIlvaine pH 6,5. As barras de erro correspondem a um intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos.

No sistema Triton X-100/sal (Figura 29), foi observada uma mudança de perfil da curva binodal, sendo mais acentuada na maior concentração de sal (1,2 M), no qual, verifica-se um ligeiro declive na curva binodal, em torno de 7 °C, com o aumento da concentração do tensoativo ($> 1\%$ p/p). Esse fenômeno também foi observado por Reffas *et al.* (2010); estes autores verificaram que a presença de 0,49 M do sal cosmotrópico sulfato de sódio, entre as concentrações de 1 - 5% p/p, promoveu um declive da curva do tensoativo Triton X-100 de aproximadamente 10 °C. Zhou *et al.* (2009) verificaram o mesmo declive da curva binodal (em torno de 10 °C) com o aumento da concentração de tensoativo de 0,25 para 10% m/v, entretanto, para o sistema Triton X-100 puro, na ausência de sal. Estes autores

também observaram um decaimento dos $T_{\text{névoa}}$ do Triton X-114 e Triton X-100 com o aumento da concentração de NaCl adicionado ao sistema.

O perfil das curvas binodais, dos tensoativos Triton X-114 e Triton X-100, frente à adição de sais, vem sendo estudado por diversos autores. Santos *et al.* (2009) investigaram a influência de diferentes concentrações dos sais cloreto de sódio, cloreto de cálcio e sulfato de magnésio, bem como as forças iônicas destes, no ponto de névoa do Triton X-114. Estes autores verificaram que a queda da temperatura do ponto de névoa seguiu a seguinte ordem: $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,25M > NaCl 0,5 M > $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,05 M $\approx$ $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,5 M $\approx$ NaCl 0,1M > $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,1M, sendo que, para o sal $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ houve uma maior queda do $T_{\text{névoa}}$, aproximadamente 7 °C, em relação ao sistema apenas em tampão McIlvaine pH 6,5 ($T_{\text{névoa}}$ = 24 °C). Gu e Galera-Gómez (1995), avaliaram o efeito da adição de eletrólitos (0,1 M) em soluções de Triton X-114 e encontraram em ordem de diminuição do ponto de névoa os seguintes sais: K_2SO_4 > LaCl_3 > NaCl $\approx$ MgCl_2 > $\text{K}_3\text{F}(\text{CN})_6$ > KNO_3 .

Koshy *et al.* (1996), estudaram a influência de diversos sais, entre eles o NaCl, na curva binodal do sistema composto pelo Triton X-114 e Triton X-100 e observaram que o decaimento da temperatura de ponto de névoa é dependente da concentração do sal, bem como da concentração de tensoativo presente no sistema. Nesta mesma linha, Jan *et al.* (2007) avaliaram o comportamento da curva binodal do sistema formado pelo Triton X-100, na presença de sais de ácido carboxílicos (como o ácido etanoico, propanoico, butanoico e hexanoico) e o NaCl. Verificou-se neste estudo, que a adição de 0,1 M do NaCl, bem como dos outros sais de ácido carboxílico, promoveu uma diminuição da temperatura em torno de 4 °C, com um valor de $T_{\text{névoa}}$ próximo a 63,5 °C, quando comparado ao sistema puro (67,5 °C). A adição de diferentes concentrações de NaCl ao sistema misto, promoveu uma redução do ponto de névoa à medida que se aumentou a concentração deste sal, sendo que os valores de $T_{\text{névoa}}$ obtidos foram de 62 e 58 °C, com a adição de 10 mM e 200 mM do sal, respectivamente. Silva (2008) avaliaram o comportamento de diversos eletrólitos e aditivos frente a soluções contendo 1,0% (v/v) de Triton X-100 em tampão fosfato pH 7,2. Dentre os aditivos analisados, aqueles que apresentaram redução na temperatura de ponto de névoa, mesmo que pouco significativa, foram classificados na seguinte ordem: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ > NaCl > CH_2CO_2 > KCl > NaNO_3 > sacarose. O aumento da concentração dos aditivos promoveu um aumento no

decaimento da temperatura de ponto de névoa, no qual, a adição de 2% (m/v) do $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ levou a redução do $T_{\text{névoa}}$ para valores próximos a 50 °C, quando comparado ao sistema puro ($T_{\text{névoa}} = 60$ °C). Com a adição de concentrações maiores desse sal, 4 e 8% (m/v), houve maior redução da temperatura, com valores de $T_{\text{névoa}}$ em torno de 45 e 30 °C, respectivamente.

5.5.3 Curvas binodais – Triton X-114/Dx-S e Triton X-100/Dx-S

As curvas binodais para os sistemas formados pelo Triton X-114 e Triton X-100 na presença do polímero sulfato de dextrana (Dx-S) em tampão McIlvaine pH 6,5 estão apresentadas nas Figuras 30 e 31. Em um primeiro momento, foram construídas curvas binodais do Triton X-114 frente às concentrações de 1, 4 e 8% (p/p) do polímero Dx-S (Figura 30). Verifica-se que a adição de 1 e 4% (p/p) do polímero promoveu uma redução do ponto de névoa do sistema, em torno de 4 °C, quando comparado ao sistema puro, entretanto, com pequena variação de temperatura, no máximo 2 °C, entre essas concentrações de polímero estudadas. A adição de 8% (p/p) do polímero promoveu um decaimento na temperatura em torno de 8 °C, com valor de $T_{\text{névoa}}$ próximo a 18,5 °C. Como pode ser observado na Figura 31, para o Triton X-100, a adição de 8% (p/p) do polímero promoveu um abaixamento na temperatura de apenas 9 °C, com valores de $T_{\text{névoa}}$ próximos a 50 °C, e, portanto, para este sistema foi adicionada uma maior concentração (14% p/p) do polímero, a fim de se obter temperaturas favoráveis (< 35 °C) para a estabilidade do ácido clavulânico nos SMDFA.

FIGURA 30 – Curvas binodais para o tensoativo Triton X-114 na presença de 1, 4, e 8% (p/p) polímero sulfato de dextrana, em tampão Mcllvaine pH 6,5. As barras de erro correspondem a um intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos.

FIGURA 31 – Curvas binodais para o tensoativo Triton X-100 na presença de 8 e 14% (p/p) polímero sulfato de dextrana, em tampão Mcllvaine pH 6,5. As barras de erro correspondem a um intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos.

De acordo com as Figuras 30 e 31, pode-se observar que a presença do polímero sulfato de dextrana resulta em menor redução do ponto de névoa, quando comparado aos estudos na presença de sal (item 5.5.2). Verifica-se que a adição de 4% (p/p) do sulfato de dextrana, para o sistema Triton X-114/polímero, permitiu a redução do $T_{névoa}$ de apenas 4 °C, sendo que na presença de 3,3% (0,25 M) do sal sulfato de amônio, esta redução foi em torno de 9 °C, ambos em relação ao sistema puro. Para o sistema Triton X-100/polímero (Figura 31), foi observado este mesmo comportamento de redução do $T_{névoa}$, em relação ao sistema na presença do sal (item 5.5.2). Na concentração de 14% (p/p) do sulfato de dextrana houve um decaimento do $T_{névoa}$ em torno de 17 °C e na presença de 15,9% (1,2 M) do sulfato de amônio esta redução foi de 34 °C, quando comparados ao $T_{névoa}$ do sistema a 1% (p/p) do Triton X-100. Portanto, estes resultados demonstram uma maior efetividade na redução do $T_{névoa}$ do sal sulfato de amônio em relação ao polímero sulfato de dextrana, para ambos os tensoativos e em todas as concentrações estudadas. Este comportamento pode ser atribuído ao fato do sal ser um eletrólito forte, isto é, em solução aquosa está presente quase que em sua totalidade como íons, neste caso NH_4^+ e o SO_4^{2-} , que possuem a capacidade de reduzir efetivamente o $T_{névoa}$ devido ao caráter cosmotrópico, quando comparado ao polímero, que atua em solução aquosa como um eletrólito fraco.

Assim como observado no sistema Triton X-100/sal (item 5.5.2), foi verificada uma alteração no perfil da curva binodal no sistema Triton X-100/polímero (Figura 30). Verifica-se um declive na curva binodal com o aumento da concentração do tensoativo (> 1% p/p), sendo mais acentuado na maior concentração do polímero. A adição de 14% (p/p) promoveu um decaimento na temperatura do ponto de névoa em torno de 20 °C, entre a menor (1,0% p/p) e maior (11% p/p) concentração de tensoativo estudada.

Galatanu *et al.* (2000) avaliaram o comportamento da curva binodal do Triton X-100 frente a adição do copolímero poli(ácido acrílico). Estes autores observaram que na presença de 1% (p/p) do copolímero, houve uma redução do ponto de névoa de 65 °C para 35 °C, na presença de 10% (p/p) do tensoativo. Entretanto, verificou-se que esta redução da temperatura foi menor em maiores concentrações do tensoativo, sendo que para o sistema a 60 (p/p)% do tensoativo houve uma queda no valor de $T_{névoa}$ de apenas 10 °C, quando comparado ao sistema puro ($T_{névoa}$ = 90 °C), na mesma concentração polimérica estudada. Nesta mesma linha, Tani *et al.*

(1998) avaliaram o efeito da adição de dois polímeros carregados, dextrana de carga positiva (DEAE-Dx) e o sulfato de dextrana (Dx-S) de carga negativa, no ponto de névoa do Triton X-114 (2% m/v), em um sistema para a extração do citocromo *b5*. Estes autores observaram que a adição de 1% (m/v) do polímero aniônico, promoveu maior redução da temperatura do ponto de névoa, $T_{\text{névoa}} = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$ para $17\text{ }^{\circ}\text{C}$, quando comparado ao catiônico, que apresentou uma redução apenas de $3\text{ }^{\circ}\text{C}$, na mesma concentração estudada. Como esperado, a redução do $T_{\text{névoa}}$, mostrou-se diretamente relacionada ao o aumento da concentração de ambos os polímeros, sendo que o aumento da concentração de 0,1% (m/v) para 1% (m/v), tanto do DEAE-Dx quanto Dx-S, resultou redução do $T_{\text{névoa}}$ em torno de $3\text{ }^{\circ}\text{C}$.

5.6 Estudos de partição do ácido clavulânico

5.6.1 Partições – Triton X-114/tampão e Triton X-100/tampão

Com base na curva binodal do Triton X-114/tampão (item 5.5.1) e nos ensaios de estabilidade do ácido clavulânico, estabeleceu-se para os ensaios iniciais de partição, as concentrações de 2 e 4% (p/p) para o tensoativo, nas temperaturas de 28, 31, $34\text{ }^{\circ}\text{C}$, em tampão McIlvaine pH 6,5. Estes parâmetros foram definidos com o objetivo de estudar a influência da concentração do tensoativo, bem como das diferentes relações entre a fase concentrada e diluída em micelas, através da variação da temperatura, no coeficiente de partição do fármaco. Os resultados do sistema Triton X-114/puro em relação ao coeficiente de partição (K_{AC}), balanço de massa (BM_{AC}) e rendimento da fase diluída (Y_{clavd}) e concentrada (Y_{clavc}) estão apresentados nas Figuras 32, 33 e 34, respectivamente. Devido à alta temperatura do ponto de névoa ($T_{\text{névoa}} = 63\text{ }^{\circ}\text{C}$) do Triton X-100, verificado através da curva binodal construída para o sistema Triton X-100/tampão, e à baixa estabilidade da biomolécula em temperaturas elevadas, o estudo de partição do ácido clavulânico em sistema puro constituído por este tensoativo foi inviável e todos os ensaios de partição foram realizados na presença de sulfato de amônio, e estão apresentados no item 5.6.2.

FIGURA 32 – Coeficientes de partição do ácido clavulânico (K_{AC}) em sistemas Triton X-114/tampão, nas concentrações de 2 e 4%(p/p) de tensoativo e temperaturas de 28, 31 e 34 °C, em tampão McIlvaine pH 6,5. As barras de erro correspondem a um intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos.

De acordo com os resultados (Figura 32), verifica-se que o coeficiente de partição do ácido clavulânico ($K_{AC} \sim 0,70$) permaneceu praticamente o mesmo, independente da temperatura de partição, concentração inicial de tensoativo empregada e razão volumétrica entre as fases obtidas (R). Contudo, para todos os ensaios, valores de K_{AC} inferiores a 1 foram obtidos, o que indica que o ácido clavulânico apresentou maior afinidade pela fase pobre em micelas (fase diluída). Considerando-se que o ácido clavulânico é uma molécula pequena e não sofre efeito de exclusão pelo volume como proteínas, esperávamos que o coeficiente de partição fosse aproximadamente 1, haja visto que em média 70% do volume das fases corresponde a água, como demonstrado por Xie *et al.* (2006). Estes autores determinaram a composição de cada fase, em % p/p, do sistema aquoso formado pelo Triton X-100 a 20 °C, sendo que a quantidade de sal, bem como a de tensoativo, foi semelhante em ambos os estudos. Esses autores verificaram através de modelagem computacional, que a porcentagem de água presente na fase diluída em micelas é maior (81 - 87%) do que na fase concentrada (60 - 74%). Como o ácido clavulânico apresenta um caráter hidrofílico predominante em relação ao hidrofóbico, a maior quantidade de água na fase diluída pode ter favorecido a migração do fármaco para esta fase preferencialmente.

Outra explicação para os coeficientes de partição inferiores a 1 seria a existência de uma diferença entre o potencial químico de ambas as fases, isto é, devido à presença de uma maior quantidade de micelas na fase concentrada, e estas estão continuamente e reversivelmente trocando monômeros entre si, há uma maior influência de diferentes forças intermoleculares como interações de Van der Waals, eletrostáticas, estéricas, hidrofóbicas e ligações de hidrogênio, quando comparada a fase pobre em micelas, e portanto, esta diferença pode ter favorecido a migração da biomolécula para a fase com um potencial químico menor, neste caso, a fase diluída. Do ponto de vista industrial, a migração preferencial do ácido clavulânico para a fase diluída em micelas é de fato muito promissor, uma vez que, a purificação por cromatografia ou adsorção, passo subsequente a técnica de extração por SMDFA, se torna mais fácil na ausência de qualquer tensoativo ou na presença de uma menor concentração deste.

Os resultados de balanço de massa (BM_{AC}) (Figura 33) mostraram que a porcentagem de ácido clavulânico não degradado nos sistemas permaneceu acima dos 85% no tempo de 3 horas de estudo. Como observado, estes resultados estão de acordo com os obtidos no estudo de estabilidade, em relação ao sistema Triton X-114/tampão (item 5.1), no qual, a porcentagem de ácido clavulânico remanescente foi em torno de 95% a 35°C, no tempo de 2 horas e em tampão McIlvaine pH 6,5. Estes resultados de BM_{AC} também estão de acordo com os obtidos por outros autores, como Santos *et al.* (2011) e Andrade *et al.* (2011), entretanto, na presença de outros tensoativos, como o aniônico AOT e o catiônico DDAO, respectivamente.

FIGURA 33 – Balanços de Massa do ácido clavulânico (BM_{AC}) em sistemas Triton X-114/tampão, nas concentrações de 2 e 4%(p/p) tensoativo e temperaturas de 28, 31 e 34 °C, em tampão Mcllvaine pH 6,5. As barras de erro correspondem a um intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos.

FIGURA 34 – Rendimento do ácido clavulânico na fase diluída - Y_{clavd} (barra azul) e concentrada - Y_{clavc} (barra vermelha) em micelas, nos sistemas Triton X-114/tampão nas concentrações de 2 e 4% (p/p) tensoativo de e temperaturas de 28, 31 e 34 °C, em tampão Mcllvaine pH 6,5. As barras de erro correspondem a um intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos.

Os resultados com relação ao rendimento na fase diluída (Y_{clavd}) e concentrada (Y_{clavc}) em micelas estão apresentados na Figura 34. Com base nos resultados obtidos, verifica-se que os valores de rendimento do ácido clavulânico, em ambas as fases, mostraram-se coerentes, já que são dependentes tanto do valor do K_{AC} quanto do R . Observa-se que o aumento da concentração de tensoativo de 2% para 4% (p/p), não influenciou na recuperação da biomolécula tanto na fase concentrada, com valores de recuperação em torno de $Y_{\text{clavc}} (2\%) = 18,9 \pm 0,3\%$ e $Y_{\text{clavc}} (4\%) = 23 \pm 1,3\%$, bem como na fase diluída, com valores em torno de $Y_{\text{clavd}} (2\%) = 70 \pm 1\%$ e $Y_{\text{clavd}} (4\%) = 77 \pm 2\%$, em sistemas com relações de fases similares ($R \sim 0,45$). Foi observado que a diminuição da temperatura de 34°C para 31°C e 28°C, promoveu um aumento do volume da fase concentrada de 0,4 e 1,8 mL, e com isso um aumento da recuperação do ácido clavulânico nesta fase, em torno de 24,9% e 124,0% ($Y_{\text{clavc}} (31^\circ\text{C}) = 29,1 \pm 0,6\%$ e $Y_{\text{clavc}} (28^\circ\text{C}) = 52 \pm 3\%$), respectivamente. Este comportamento do ácido clavulânico era esperado, uma vez que, está intimamente relacionado com a alteração do volume das fases do sistema, que como visto, pode acarretar em um aumento ou diminuição da porcentagem de recuperação do fármaco na fase concentrada ou diluída. Entretanto, este perfil de recuperação do fármaco, influenciado pelo aumento do volume das fases não é vantajoso para um sistema de purificação em duas fases aquosas, uma vez que, não permite a pré-concentração do analito em um volume menor da fase, geralmente < 0,5 mL, com elevados valores de rendimento.

Lee e Su (1999) estudaram a separação do 6-aminopenicilânico (6-APA), um intermediário dos antibióticos β -lactâmicos como a ampicilina, em sistema formado pelo tensoativo aniônico óxido de n - deciltetraetilenos (C_{10}E_4), e verificaram que este intermediário migrou preferencialmente para a fase diluída, com valores de coeficiente de partição semelhantes ao observado neste estudo para o ácido clavulânico ($K < 1,0$). Santos *et al.* (2011) estudaram a recuperação do ácido clavulânico, obtido do meio de fermentação, em um sistema micelar misto formado pelos tensoativos Triton X-114 e AOT (aniônico). Estes autores verificaram que o fármaco teve uma maior afinidade para a fase diluída ($K_{\text{AC}} > 1$), no qual, o aumento da concentração do tensoativo aniônico de 0,02% para 0,04% (p/p) promoveu um aumento do coeficiente de partição de $K_{\text{AC}} = 1,15$ para 1,31. Este resultado foi condizente com o esperado, uma vez que, a adição do tensoativo aniônico tinha por objetivo promover a repulsão eletrostática da biomolécula negativamente carregada

para a fase pobre em micelas. Nesta mesma proposta, Andrade *et al.* (2011) avaliaram a extração do ácido clavulânico em sistema misto formado pelos tensoativos C₁₀E₄ (aniônico) e o dodecil dimetilamina (DDAO – zwitteriônico: carga positiva no pH 5,0), na presença de 0,2 M NaBr. Estes autores observaram que os valores do coeficiente de partição (K_{AC}) ficaram em torno de 1, o que indica que a biomolécula se distribuiu igualmente entre as fases do sistema, independente da concentração do tensoativo DDAO estudada (0,4, 0,6 e 1%). Com a adição de 0,2% do C₁₀E₄, foi verificado que não houve variação do coeficiente de partição ($K_{AC} \sim 1$), com valores de recuperação do fármaco na fase diluída (Y_{clavd}) em torno de 72%.

5.6.2 Partições – Triton X-114/sal e Triton X-100/sal

5.6.2.1 Partições – Triton X-114/(NH₄)₂SO₂

Tendo em vista as curvas binodais do Triton X-114 obtidas na presença do sal sulfato de amônio, bem como os resultados de partição do ácido clavulânico em sistema Triton X-114/tampão, estabeleceu-se para os ensaios iniciais de partição na presença de 0,25 M (NH₄)₂SO₂ as concentrações de 2 e 4% (p/p) de tensoativo, nas temperaturas de 18,6, 21,6 e 24,6 °C, em tampão McIlvaine pH 6,5, para que fossem obtidas relações volumétrica das fases semelhantes nos sistemas na ausência e presença do sal. Os resultados em relação ao coeficiente de partição (K_{AC}), balanço de massa (BM_{AC}) e rendimento da fase diluída (Y_{clavd}) e concentrada (Y_{clavc}) estão apresentados nas Figuras 35, 36 e 37, respectivamente.

FIGURA 35 – Coeficientes de partição do ácido clavulânico (K_{AC}) em sistemas Triton X-114/0,25M $(NH_4)_2SO_4$, nas concentrações de 2 e 4% (p/p) tensoativo e temperaturas de 18,6, 21,6 e 24,6 °C, em tampão McIlvaine pH 6,5. As barras de erro correspondem a um intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos.

Como pode ser observado, não houve variação significativa do coeficiente de partição do ácido clavulânico ($K_{AC} \sim 0,70$), tanto com o aumento da concentração do tensoativo de 2% para 4% (p/p), em sistemas com valores de relação entre as fases similares, isto é, $R = 0,39 \pm 0,05$ e $0,46 \pm 0,01$, respectivamente, quanto comparado ao sistema na ausência de sal (item 5.6.1). Observa-se também que o aumento desta relação, ocasionado pela diminuição da temperatura, como a 21,6 °C ($R = 0,61 \pm 0,02$) e 18,6 °C ($R = 2,28 \pm 0,20$), não promoveu uma variação significativa no coeficiente de partição (K_{AC}). Portanto, verifica-se que a presença do sal não afetou o particionamento preferencial da biomolécula no sistema, sendo que para todos os ensaios valores de K_{AC} inferiores a 1 foram obtidos, o que indica que o ácido clavulânico apresentou maior afinidade pela fase pobre em micelas (fase diluída), semelhante ao observado nos ensaios na ausência do sal.

Com a adição de sal no sistema, era esperado que a quantidade de $(NH_4)_2SO_4$ na fase diluída fosse maior, devido ao seu caráter de dissociação e solvatação pela água. Sendo assim, acreditávamos que esse aditivo fosse capaz de promover uma repulsão eletrostática significativa entre os íons sulfato e o ácido clavulânico, fazendo com que a biomolécula migrasse preferencialmente para a fase concentrada em micelas e, consequentemente, maiores valores de coeficiente de

partição fossem obtidos. Como esse efeito não foi observado nas partições com 0,25 M do sal, a determinação da condutância elétrica de cada uma das fases (mS) foi realizada. Como pode ser verificado nos resultados apresentados na Tabela 2, o sal particionou-se igualmente entre as fases concentrada e diluída, com valores de condutância elétrica em torno de 40 mS e, com isso, o potencial eletrostático não foi suficiente para influenciar a partição do ácido clavulânico no sistema.

Tabela 2 - Condutância elétrica das fases diluída (F_d) e concentrada (F_c) dos ensaios em sistemas Triton X-114/0,25 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

TX-114 (% p/p)	T (°C)	F_d (mS)	F_c (mS)
2	18,6	42,6 ± 5,7	39,3 ± 7,6
4	24,6	38,0 ± 3,6	40,7 ± 7,8
4	21,6	45,6 ± 0,9	38,6 ± 7,5
4	18,6	42,0 ± 8,6	38,6 ± 5,7

Os resultados de balanço de massa (BM_{AC}) (Figura 36) mostraram que a porcentagem de ácido clavulânico não degradado nos sistemas permaneceu acima dos 85% no tempo de 2 horas de estudo, semelhante ao observado no sistema Triton X-114/puro. Nos estudos de estabilidade verificou-se que o ácido clavulânico teve uma maior degradação na presença do sal sulfato de amônio, independente da concentração estudada. Entretanto, estes resultados de BM_{AC} estão de acordo com o esperado, uma vez que, o tempo para a separação de fases foi relativamente curto (2 horas), e, portanto, a porcentagem do fármaco remanescente ainda é superior a 85%.

FIGURA 36 – Balanço de massa do ácido clavulânico (BM_{AC}) em sistemas Triton X-114/0,25M $(NH_4)_2SO_4$, nas concentrações de 2 e 4%(p/p) tensoativo e temperaturas de 18,6, 21,6 e 24,6 °C, em tampão Mcllvaine pH 6,5. As barras de erro correspondem a um intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos.

FIGURA 37 – Rendimento do ácido clavulânico na fase diluída - Y_{clavd} (barra azul) e concentrada - Y_{clavc} (barra vermelha) em micelas, nos sistemas Triton X-114/0,25 M $(NH_4)_2SO_4$ nas concentrações de 2 e 4% (p/p) tensoativo e temperaturas de 18,6, 21,6 e 24,6 °C, em tampão Mcllvaine pH 6,5. As barras de erro correspondem a um intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos.

De acordo com a Figura 37, semelhantemente ao observado no sistema na ausência de sal, verifica-se que o aumento da concentração de tensoativo de 2% para 4% (p/p) na presença de 0,25 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, não influenciou na recuperação da biomolécula tanto na fase concentrada, com valores de recuperação em torno de $Y_{\text{clavc}} (2\%) = 23 \pm 7\%$ e $Y_{\text{clavc}} (4\%) = 26 \pm 5\%$, quanto na fase diluída, com valores em torno de $Y_{\text{clavd}} (2\%) = 80 \pm 8\%$ e $Y_{\text{clavd}} (4\%) = 74 \pm 2\%$, em sistemas com relações de fases similares ($R \sim 0,45$). Em relação à temperatura, também verificou-se o mesmo comportamento do sistema na ausência de sal, isto é, com a diminuição da temperatura de 24,6 °C para 18,6 °C, houve um aumento do volume da fase concentrada de 1,9 mL e com isso um aumento na recuperação do ácido clavulânico nesta fase, em torno de 111% ($Y_{\text{clavc}} (18,6 \text{ °C}) = 52 \pm 6\%$). Entretanto, verifica-se que para a temperatura de 21,6°C, não houve um aumento do rendimento na fase concentrada ($Y_{\text{clavc}} (21,6 \text{ °C}) = 27 \pm 5\%$) quando comparado à temperatura de 24,6 °C, devido a pouca diferença entre os volumes da fases concentradas, isto é, em torno de 0,3 mL. Todos os resultados obtidos com relação ao rendimento na fase diluída (Y_{clavd}) e concentrada (Y_{clavc}) mostraram-se coerentes, já que são dependentes tanto do valor do K_{AC} quanto do R .

5.6.2.2 Partições – Triton X-100/ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_2$

De acordo com as curvas binodais construídas na presença do sal sulfato de amônio, com os resultados de partição do ácido clavulânico no sistema Triton X-114 e com a instabilidade do ácido clavulânico em altas temperaturas (Bersanetti, *et al.*, 2005; Santos *et al.*, 2009) foram realizados ensaios de partição do ácido clavulânico em sistema Triton X-100/sal, nas concentrações de 2 e 4% (p/p) do tensoativo e em diferentes concentrações do sulfato de amônio, como 0,8, 1,2 e 1,6 M. Não foram realizadas partições em sistemas com 0,4 M de sal, pois a temperatura de ponto de névoa permaneceu acima 44 °C, o que levaria à degradação do fármaco. Portanto foi escolhida a concentração de 0,8 M de sal para o início dos ensaios, sendo que as outras concentrações de sulfato de amônio foram escolhidas por apresentarem efeitos significativos na redução do ponto de névoa, obtendo menores valores de temperatura para a realização dos ensaios de partição. Os resultados do sistema Triton X-100/ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ em relação ao coeficiente de partição (K_{AC}), balanço de

massa (BM_{AC}) e rendimento da fase diluída (Y_{clavd}) e concentrada (Y_{clavc}) estão apresentados nas Figuras 38/39, 40 e 41, respectivamente.

FIGURA 38 – Coeficientes de partição do ácido clavulânico (K_{AC}) em sistema Triton X-100/0,8 M $(NH_4)_2SO_4$, nas concentrações de tensoativo de 2 e 4% (p/p) e temperaturas de 33 e 39 °C, em tampão McIlvaine pH 6,5. As barras de erro correspondem a um intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos.

Como pode ser observado, não houve variação significativa do coeficiente de partição ($K_{AC} \sim 0,65$) independente da concentração de tensoativo e temperatura empregados. O aumento da relação de fases, ocasionado pela diminuição da temperatura como a 33 °C ($R = 0,55 \pm 0,03$), também não promoveu variação significativa no coeficiente de partição (K_{AC}), permanecendo com valores próximos a 0,65. É possível verificar que os coeficientes de partição dos sistemas Triton X-100/sal apresentaram valores semelhantes ($K \sim 0,65$) ao sistema Triton X-114 na ausência e presença de sal, ambos com valores $K_{AC} \sim 0,7$. Sendo assim, para todos os ensaios valores de K_{AC} inferiores a 1 foram obtidos, semelhante ao observado nos ensaios nos sistemas formado pelo Triton X-114. Este comportamento similar entre os sistemas Triton X-114 e Triton X-100 era esperado, uma vez que, estes tensoativos possuem a estrutura química semelhante, diferenciados apenas pelo número de unidades de óxido de etileno na porção polar da molécula, sendo esta variação de no máximo 3 unidades.

Com a adição de concentrações mais altas de $(NH_4)_2SO_4$ (0,8 M), quando comparado ao sistema Triton X-114/0,25 M, esperava-se que houvesse alteração no

perfil de partição da biomolécula, promovendo um aumento no coeficiente de partição devido à migração da biomolécula para a fase concentrada. Entretanto, assim como nos sistemas compostos por Triton X-114 na ausência e presença do sal, esse efeito não foi observado. A determinação da condutância elétrica de cada uma das fases (mS) foi realizada e está apresentada na Tabela 3.

Tabela 3 - Condutância elétrica das fases diluída (F_d) e concentrada (F_c) dos ensaios em sistemas Triton X-100/0,8 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

X-114 (% p/p)	T (°C)	F_d (mS)	F_c (mS)
2	33	132 ± 18	115 ± 13
4	33	$135,4 \pm 0,4$	117 ± 19
4	39	131 ± 13	113 ± 18

Como pode ser observado nos resultados apresentados na Tabela 3, o sulfato de amônio apresentou partição levemente preferencial para a fase diluída, com valores de condutância elétrica em torno de 115 mS na fase concentrada e 130 mS na fase diluída. Entretanto, verifica-se que esta diferença de concentração de sal entre as fases, não foi suficiente para influenciar a partição do ácido clavulânico no sistema. Portanto, concentrações maiores de sal, como 1,2 e 1,6 M, foram estudadas e os resultados em relação ao coeficiente de partição estão apresentados na Figura 39.

FIGURA 39 – Coeficientes de partição do ácido clavulânico (K_{AC}) em sistemas com 4% (p/p) de Triton X-100, nas concentrações de 1,2 M e 1,6 M $(NH_4)_2SO_4$, e nas temperaturas de 17 e 3 °C, respectivamente, em tampão McIlvaine pH 6,5. As barras de erro correspondem a um intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos.

Verifica-se que a presença de maiores concentrações do sulfato de amônio não afetou a migração preferencial da biomolécula no sistema, apresentando valores de K_{AC} inferiores a 1,0. Para ambos os sistemas estudados, não houve variação do coeficiente de partição ($K_{AC} \sim 0,7$), embora tenha sido verificada uma diferença entre a condutância elétrica das fases, com valores em torno de 217 ± 8 e 282 ± 17 mS na fase diluída e 131 ± 22 e 168 ± 23 mS na fase concentrada, na presença de 1,2 e 1,6M do sal, respectivamente. Nota-se que a presença de maior quantidade de sal na fase diluída em micelas acarretou em um aumento da densidade desta fase, ocasionando a inversão de fases no sistema. Portanto, no sistema Triton X-100/tampão na presença de 1,2 e 1,6 M $(NH_4)_2SO_4$, a fase inferior consistiu na fase diluída em micelas.

De acordo com os resultados de BM_{AC} (Figura 40), a porcentagem de ácido clavulânico não degradado nos sistemas permaneceu acima dos 85% no tempo de 2 horas de estudo, semelhante ao observado nos estudos de estabilidade do ácido clavulânico frente à presença do sulfato de amônio (item 5.2).

FIGURA 40 – Balanço de massa do ácido clavulânico (BM_{AC}) nos sistemas Triton X-100/0,8 M $(NH_4)_2SO_4$ a 33 e 39 °C, Triton X-100/1,2 M $(NH_4)_2SO_4$ a 17 °C e Triton X-100/1,6 M $(NH_4)_2SO_4$ a 3 °C, nas concentrações de 2 e 4% (p/p) tensoativo, em tampão Mcllvaine pH 6,5. As barras de erro correspondem a um intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos.

FIGURA 41 – Rendimento do ácido clavulânico na fase diluída - Y_{clavd} (barra azul) e concentrada - Y_{clavc} (barra vermelha) em micelas, nos sistemas Triton X-100/0,8 M $(NH_4)_2SO_4$ a 33 e 39 °C, Triton X-100/1,2 M $(NH_4)_2SO_4$ a 17 °C e Triton X-100/1,6M $(NH_4)_2SO_4$ a 3 °C, nas concentrações de 2 e 4% (p/p) tensoativo, em tampão Mcllvaine pH 6,5. As barras de erro correspondem a um intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos.

Pode-se observar pela Figura 41, que na presença de 0,8 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, o aumento da concentração 2% para 4% (p/p) de tensoativo, não influenciou na recuperação da biomolécula tanto na fase concentrada, com valores de recuperação em torno de $Y_{\text{clavc}}(2\%) = 12 \pm 6\%$ e $Y_{\text{clavc}}(4\%) = 23 \pm 3\%$, quanto na fase diluída, com valores em torno de $Y_{\text{clavd}}(2\%) = 80 \pm 6\%$ e $Y_{\text{clavd}}(4\%) = 75 \pm 6\%$, em sistemas com $R = 0,25 \pm 0,01$ e $0,22 \pm 0,01$, respectivamente. Em relação à temperatura, também verifica-se o mesmo comportamento do sistema Triton X-114 na ausência e presença de sal, isto é, com a diminuição da temperatura de 39 °C para 33 °C, houve um aumento do volume da fase concentrada de 0,9mL, e com isso um aumento na recuperação do ácido clavulânico na fase concentrada, em torno de 184% ($Y_{\text{clavc}}(33^\circ\text{C}) = 66 \pm 5\%$). Com a adição de 1,2 e 1,6 M de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, observa-se que não houve alteração na recuperação do ácido clavulânico em ambas as fases. Tais resultados comprovam que o sulfato de amônio, adicionado ao sistema em diferentes concentrações, não influenciou a migração da biomolécula para a fase concentrada, não havendo aumento na recuperação do ácido clavulânico nesta fase, em sistemas com $R \sim 0,25$.

Santos *et al.* (2011) também estudaram a recuperação do ácido clavulânico, obtido do meio de fermentação, em um sistema micelar misto formado pelos tensoativos Triton X-114 e AOT (aniônico), na presença de diferentes concentrações do sal NaCl. Estes autores verificaram que a presença do sal não afetou o coeficiente de partição da biomolécula ($K_{\text{AC}} \sim 1,25$), no tempo de 3 horas, quando comparado aos sistemas na ausência de sal.

5.6.3 Partições – Triton X-114/polímero e Triton X-100/polímero

5.6.3.1 Partições – Triton X-114/Dx-S

Com base nas curvas binodais obtidas do Triton X-114 na presença do sulfato de dextrana (Dx-S) e nos resultados do sistema Triton X-114/tampão, foram realizados ensaios de partição do ácido clavulânico em sistema Triton X-114/polímero, nas concentrações de 2 e 4% (p/p) do tensoativo e em diferentes concentrações do polímero como 1, 4 e 8% (p/p). Para estes sistemas, esperávamos que a presença do polímero aniônico promovesse a repulsão eletrostática do ácido

clavulânico para a fase micelar, e valores de K_{AC} superiores a 1 fossem obtidos. Os resultados em relação ao coeficiente de partição (K_{AC}), balanço de massa (BM_{AC}) e rendimento da fase diluída (Y_{clavd}) e concentrada (Y_{clavc}) estão apresentados nas Figuras 42/43, 44 e 45, respectivamente.

FIGURA 42 – Coeficientes de partição do ácido clavulânico (K_{AC}) em sistema Triton X-114/Dx-S, nas concentrações de 2 e 4% (p/p) tensoativo e 1, 4 e 8% (p/p) sulfato de dextrana (Dx-S), em tampão McIlvaine pH 6,5. As barras de erro correspondem a um intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos.

De acordo com os resultados do coeficiente de partição, apresentados na Figura 42, verifica-se que no sistema com 2% (p/p) de Triton X-114 na presença de 1% (p/p) do sulfato de dextrana não houve alteração significativa do coeficiente de partição, com valores de K_{AC} em torno de 0,6 ($R = 0,27 \pm 0,02$) quando comparado ao sistema na ausência do polímero, que apresentou valores de $K_{AC} \sim 0,7$ e relação de fases $R \sim 0,35$ (item 5.6.1). Observa-se que nos sistemas com 4% (p/p) do tensoativo, a presença de 1% (p/p) do polímero também não afetou o coeficiente de partição da biomolécula, bem como com o aumento da concentração do polímero para 4% (p/p), com valores de $K_{AC} \sim 0,60$, considerando-se o erro experimental.

Esperava-se que a presença de 1 ou 4% (p/p) do sulfato de dextrana fosse suficiente para promover um aumento significativo no coeficiente de partição do ácido clavulânico, devido ao seu caráter aniônico e alto peso molecular (500.000 Da). Entretanto, apenas com o aumento da concentração do polímero para 8% (p/p) verificou-se um leve aumento no coeficiente de partição do ácido clavulânico, com

K_{AC} em torno de $0,90 \pm 0,08$ em um sistema com relação de fase igual a $0,46 \pm 0,08$. Contudo, este valor de K_{AC} ainda é inferior a 1 e portanto, o sulfato de dextrana não promoveu repulsão eletrostática da biomolécula para a fase oposta, ou seja, micelar. Com base nestes resultados, a influência de concentrações mais elevadas do polímero (14% p/p) no coeficiente de partição da biomolécula foi estudada, e os resultados estão apresentados na Figura 43.

FIGURA 43 – Coeficientes de partição do ácido clavulânico (K_{AC}) em sistema Triton X-114/Dx-S, nas concentrações de 9% (p/p) tensoativo e 14% (p/p) sulfato de dextrana (Dx-S), em tampão McIlvaine pH 6,5. As barras de erro correspondem a um intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos.

A fim de se estudar a influência de uma maior concentração do sulfato de dextrana, foi necessária a presença de maiores concentrações do tensoativo (9% p/p), uma vez que, a adição de 14% (p/p) do polímero em concentrações baixas de tensoativo, como 2 e 4% (p/p), acarreta em uma diminuição da temperatura do ponto de névoa, com valores abaixo de 0°C. Com base na Figura 43, observa-se que o aumento da concentração do polímero para 14% (p/p) promoveu um leve aumento no coeficiente de partição do ácido clavulânico, com valores K_{AC} em torno de $1,16 \pm 0,11$ e $1,30 \pm 0,16$, para os sistemas com relação de fases $R = 0,67 \pm 0,01$ e $0,92 \pm 0,09$, respectivamente. Apesar deste aumento no coeficiente de partição quando comparado ao sistema na presença de 1% (p/p) do polímero, nota-se que os valores de K_{AC} obtidos foram muito próximos a 1 - 1,5, considerando-se o erro experimental. Como não houve um aumento significativo no coeficiente de partição, indicativo de

uma repulsão eletrostática do ácido clavulânico frente à carga negativa do polímero para a fase micelar, a determinação da condutância elétrica de cada uma das fases (F) dos sistemas com 8 e 14% (p/p) polímero foi realizada, e os resultados estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 - Condutância elétrica das fases diluída (F_d) e concentrada (F_c) em micelas dos ensaios em sistemas Triton X-100/Dx-S.

TX-114 (% p/p)	T (°C)	Dx-S (% p/p)	F_d (mS)	F_c (mS)
4	27	8	$1,6 \pm 0,2$	$0,7 \pm 0,1$
9	26	14	$2,4 \pm 0,2$	$1,6 \pm 0,1$
9	23	14	$2,6 \pm 0,3$	$1,5 \pm 0,2$

Pode-se observar nos resultados apresentados na Tabela 4, que a diferença entre a condutância elétrica da fase diluída (rica em polímero) e concentrada em micelas foi relativamente pequena, em ambos os sistemas, com valores de condutância em torno de 1,6 mS e 0,7 mS para o sistema com 8% (p/p) do polímero e 2,5 mS e 1,5 mS para os sistemas com 14% (p/p) do polímero, respectivamente. Portanto, verifica-se que a diferença da condutância elétrica entre as fases não foi suficiente para influenciar a partição do ácido clavulânico, independente da concentração de polímero estudada. Devido a esta pequena diferença entre a condutância elétrica de ambas as fases não foi possível determinar se houve inversão de fases nos sistemas, e, portanto, a quantificação em massa (mg) do tensoativo, em cada fase, foi realizada espectrofotometricamente (274 nm) e os resultados estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5 – Determinação da quantidade de tensoativo, em massa (mg), presente nas fases superior ($F_{\text{sup.}}$) e inferior ($F_{\text{inf.}}$) dos sistemas Triton X-114/Dx-S.

TX-114 (% p/p)	T (°C)	Dx-S (% p/p)	TX-114 $F_{\text{sup.}}$ (mg)	TX-114 $F_{\text{inf.}}$ (mg)
4	28,4	1	$16,8 \pm 0,2$	202 ± 26
4	27,4	4	17 ± 2	175 ± 6
4	27	8	165 ± 15	19 ± 4
9	26	14	383 ± 22	8 ± 4
9	23	14	400 ± 13	9 ± 3

Com base nos resultados da Tabela 5, observa-se nos sistemas a 1 e 4% (p/p) de sulfato de dextrana, que a presença do polímero não influenciou no fenômeno de separação de fases, uma vez que, maiores quantidades em massa do tensoativo foram detectadas na fase inferior, com valores em torno de 202 ± 26 mg e 175 ± 6 mg, respectivamente, quando comparado a fase superior, que apresentou valores de massa em torno de 16 mg, em ambos os sistemas. Entretanto, verifica-se a uma maior quantidade do tensoativo na fase superior, com valores de massa em torno de 165 e 390 mg para os sistemas com 8 e 14% (p/p) polímero, respectivamente. Estes resultados demonstraram que a adição de maiores concentrações do sulfato de dextrana ($\geq 8\%$ p/p) promove a inversão de fases nos sistemas, sendo a fase inferior correspondente à fase diluída ou pobre em micelas (polimérica), e fase superior à fase rica em micelas, isto é, concentrada ou micelar.

Os resultados de balanço de massa (BM_{AC}) (Figura 44) mostraram que a porcentagem de ácido clavulânico não degradado nos sistemas permaneceu acima de 80% no tempo de 24 horas de estudo. Como observado, estes resultados estão de acordo com os obtidos no estudo de estabilidade, em relação ao sistema Triton X-114/polímero (item 5.3), no qual a porcentagem de ácido clavulânico remanescente foi superior a 70% a 20 °C, no tempo de 24 horas e em tampão McIlvaine pH 6,5.

FIGURA 44 – Balanço de massa do ácido clavulânico (BM_{AC}) nos sistemas Triton X-114/Dx-S, em tampão Mcllvaine pH 6,5. As barras de erro correspondem a um intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos.

FIGURA 45 – Rendimento do ácido clavulânico na fase diluída - Y_{clavd} (barra azul) e concentrada - Y_{clavc} (barra vermelha) em micelas, nos sistemas Triton X-114/Dx-S, em tampão Mcllvaine pH 6,5. As barras de erro correspondem a um intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos.

Como pode ser observado na Figura 45, na presença de 1% (p/p) do polímero, os rendimentos da fase concentrada e diluída, do sistema 2% Triton X-114/Dx-S, tiveram valores de $Y_{clavc} = 12 \pm 8\%$ e $Y_{clavd} = 78 \pm 4\%$, com relação de fases de $0,27 \pm 0,02$. Nota-se que a presença do polímero, neste sistema, não

acarretou em uma mudança significativa de rendimento na fase concentrada e diluída, quando comparado aos sistemas puro (item 5.6.1) e na presença do $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (item 5.6.2.2), sendo que os rendimentos nestes sistemas ficaram em torno de 20 e 70% na fase concentrada e diluída em micelas, respectivamente, em sistemas com valores de $R \sim 0,35$. Para o sistema 4% (p/p) Triton X-114/1% (p/p) Dx-S, observa-se também que o polímero não influenciou na recuperação da biomolécula, com valores de recuperação em torno de $Y_{\text{clavc}} = 22 \pm 8\%$ e $Y_{\text{clavd}} = 61 \pm 5\%$, se comparado ao sistema na ausência do sal, que apresentou valores de $Y_{\text{clavc}} = 29,1 \pm 0,6\%$ e $Y_{\text{clavd}} = 62,4 \pm 0,1\%$, ambos em sistemas com $R \sim 0,65$. Verifica-se que o aumento da concentração de polímero também não promoveu alteração nos valores de rendimentos, em ambas as fases, tanto para o sistema com 4% (p/p) de polímero quanto para o sistema com 8% (p/p) de polímero. Contudo, na presença de 14% (p/p) do polímero, observa-se que houve um ligeiro aumento nos valores de rendimento da biomolécula na fase concentrada, com valores de $Y_{\text{clavc}} = 36 \pm 9\%$, associado a um leve decaimento do rendimento na fase diluída, $Y_{\text{clavd}} = 47 \pm 11\%$, se considerarmos o erro experimental. Como esperado, com a diminuição da temperatura para 23 °C houve um aumento do volume da fase concentrada, em torno de 0,5mL, porém insuficiente para influenciar na recuperação da biomolécula ($Y_{\text{clavc}} = 45 \pm 7\%$).

Todos estes resultados obtidos, em relação ao rendimento do ácido clavulânico, na fase concentrada e diluída (fase polimérica) em micelas, mostraram-se coerentes, já que são dependentes tanto do valor do K_{AC} quanto do R . É importante ressaltar, que os estudos com uma maior concentração do sulfato de dextrana se tornaram inviáveis, devido ao aumento considerável da viscosidade em concentrações de polímero superior a 15% (p/p), que acarreta em perda da sensibilidade do sistema.

5.6.3.2 Partições - Triton X-100/Dx-S

Com base nos resultados obtidos nos sistemas Triton X-114/Dx-S foram realizados estudos das partições do ácido clavulânico em sistema 9% (p/p) Triton X-100 na presença de 14% (p/p) sulfato de dextrana. Não foram realizados ensaios de partição na presença de menores concentrações de tensoativo (2 ou 4% p/p), já que como visto nos estudos da curva binodal do Triton X-100 (Figura 27), o aumento da concentração do polímero promove declive na curva binodal (redução do $T_{névoa}$) frente ao aumento da concentração de tensoativo, e portanto, em maiores concentrações do Triton X-100 os valores de $T_{névoa}$ são mais baixos, sendo mais favoráveis para a manutenção da estabilidade do ácido clavulânico. Entretanto, foi verificada a necessidade da adição de 0,1M $(NH_4)_2SO_4$ nos sistemas, visando maior redução do $T_{névoa}$. Os resultados em relação ao coeficiente de partição (K_{AC}), balanço de massa (BM_{AC}) e rendimento da fase diluída (Y_{clavd}) e concentrada (Y_{clavc}) estão apresentados nas Figuras 46, 47 e 48, respectivamente.

FIGURA 46 – Coeficientes de partição do ácido clavulânico (K_{AC}) em sistema Triton X-100/Dx-S, na concentração de 9% (p/p) tensoativo e 14% (p/p) do sulfato de dextrana (Dx-S), na ausência e presença de 0,1 M $(NH_4)_2SO_4$, em tampão McIlvaine pH 6,5. As barras de erro correspondem a um intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos.

De acordo com os resultados apresentados na Figura 46, verifica-se um leve aumento nos coeficientes de partição nos sistemas Triton X-100/Dx-S quando comparado aos resultados obtidos na presença de 0,8 ou 1,2 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (item 5.6.2.2). Nota-se que no sistema Triton X-100/Dx-S, na temperatura de 42°C, houve um aumento do coeficiente de partição da biomolécula, com valores de $K_{AC} = 1,83 \pm 0,21$ se comparado ao sistema Triton X-100/ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ que apresentou $K_{AC} \sim 0,7$. O mesmo comportamento foi observado nos sistemas Triton X-100/Dx-S na presença de 0,1 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, em temperaturas mais amenas como 10 e 14 °C, no qual se obteve valores de coeficientes de partição em torno de $K_{AC} = 1,31 \pm 0,28$ e $1,33 \pm 0,24$, respectivamente, valores muito próximos aos obtidos nos ensaios dos sistemas Triton X-114/Dx-S (item 5.6.3.1), em sistemas com relação de fases similares ($R \sim 0,8$). Contudo, assim como nos ensaios frente ao Triton X-114, os valores de K_{AC} obtidos permaneceram próximos a 1 - 1,5, se considerado o erro experimental, o que demonstra que a presença de 14% (p/p) do sulfato de dextrana não influenciou na partição do ácido clavulânico nos sistemas formados pelo Triton X-100, sendo assim também foi determinada a condutância elétrica de cada uma das fases (F) dos sistemas, e os resultados estão apresentados na Tabela 6.

Tabela 6 - Condutância elétrica das fases diluída (F_d) e concentrada (F_c) em micelas dos ensaios em sistemas Triton X-100/14% Dx-S.

TX-100 (% p/p)	T (°C)	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (M)	F_d (mS)	F_c (mS)
9	42	-	$2,29 \pm 0,12$	$1,37 \pm 0,06$
9	10	0,1	$3,28 \pm 0,25$	$2,44 \pm 0,15$
9	14	0,1	$3,22 \pm 0,17$	$2,55 \pm 0,26$

Assim como nos resultados de condutância elétrica dos sistemas Triton X-114/Dx-S (item 5.6.3.1), pode-se observar nos resultados apresentados na Tabela 6, que a diferença entre a condutância elétrica da fase diluída (polimérica) e concentrada em micelas foi relativamente pequena, em ambos os sistemas, isto é, na ausência do sal com valores de condutância em torno de $2,29 \pm 0,12$ mS na fase diluída e $1,37 \pm 0,06$ mS na fase concentrada, e na presença de 0,1 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, com valores de condutância em torno de $3,28 \pm 0,25$ mS e $2,44 \pm 0,15$ mS e $3,22 \pm 0,17$ mS e $2,55 \pm 0,26$ mS na fase diluída e concentrada dos sistemas a 10 °C e 14

°C, respectivamente. Deste modo, esta diferença de condutância elétrica entre as fases não foi suficiente para influenciar a partição do ácido clavulânico. A fim de se comprovar a inversão de fases dos sistemas, foi realizada a quantificação em massa (mg) do tensoativo em cada fase, espectrofotometricamente (274 nm) e os resultados estão apresentados na Tabela 7.

Tabela 7 – Determinação da quantidade de tensoativo, em massa (mg), presente nas fases superior ($F_{sup.}$) e inferior ($F_{inf.}$) nos ensaios em sistemas Triton X-100/14% Dx-S.

TX-100 (% p/p)	T (°C)	(NH ₄) ₂ SO ₄ (M)	TX-100 $F_{sup.}$ (mg)	TX-100 $F_{inf.}$ (mg)
9	42	-	407,6 ± 29,2	5,32 ± 0,5
9	10	0,1	388,3 ± 9,5	30,9 ± 6,9
9	14	0,1	387,8 ± 10,0	31,9 ± 4,7

A partir dos resultados apresentados na Tabela 7, verifica-se a presença de maior quantidade do tensoativo na fase superior, com valores em torno de 400 mg, tanto na ausência como na presença do (NH₄)₂SO₄, o que comprova que a adição de maiores concentrações do sulfato de dextrana promove a inversão de fases nos sistemas, sendo neste caso, a fase inferior correspondente à fase diluída ou pobre em micelas (polimérica), e fase superior à fase rica em micelas, isto é, concentrada ou micelar.

Os resultados de balanço de massa (BM_{AC}) (Figura 47) frente à temperatura mais elevada como 42 °C mostraram que a porcentagem de ácido clavulânico degradado nos sistemas permaneceu em torno de 50% no tempo de 24 horas de estudo. Como observado, este resultado está de acordo com os estudos prévios de estabilidade da biomolécula frente à temperatura de 45 °C, que apresentou valores de porcentagem de ácido clavulânico remanescente ≤ 60%, no mesmo tempo estudado. Para os sistemas realizados em temperaturas mais baixas, como 10 e 14° C, observa-se que os valores de balanço de massa foram em torno de 80%, compatível com os estudos de estabilidade a 20 °C na ausência e presença do polímero, que apresentaram porcentagens de ácido clavulânico remanescente ≥ 75%.

FIGURA 47 – Balanço de massa do ácido clavulânico (BM_{AC}) nos sistemas Triton X-100/Dx-S, na concentração de 9% (p/p) tensoativo e 14% (p/p) sulfato de dextrana (Dx-S), na ausência e presença de 0,1 M $(NH_4)_2SO_4$, em tampão Mcllvaine pH 6,5. As barras de erro correspondem a um intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos.

FIGURA 48 – Rendimento do ácido clavulânico na fase diluída - Y_{clavd} (barra azul) e concentrada - Y_{clavc} (barra vermelha) em micelas, nos sistemas Triton X-100/Dx-S, na concentração de 9% (p/p) tensoativo e 14% (p/p) sulfato de dextrana (Dx-S), na ausência e presença de 0,1 M $(NH_4)_2SO_4$, em tampão Mcllvaine pH 6,5. As barras de erro correspondem a um intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos.

De acordo com a Figura 48, verifica-se que no sistema Triton X-100/Dx-S a 42 °C, os rendimentos da fase concentrada e diluída tiveram valores de $Y_{\text{clavc}} = 44,9 \pm 0,4\%$ e $Y_{\text{clavd}} = 7,4 \pm 0,8\%$, respectivamente. Observa-se que neste sistema houve menor recuperação do ácido clavulânico na fase diluída, contudo, este fato não é atribuído à repulsão eletrostática do ácido clavulânico para a fase micelar, mas sim devido ao maior volume (mL) da fase concentrada ($R = 3,39 \pm 0,01$) quando comparada a fase diluída, que acarretou em maior recuperação do fármaco nesta fase. Como esperado, com a diminuição da temperatura para 14 °C ($R = 1,06 \pm 0,26$) e 10 °C ($R = 0,73 \pm 0,09$) observa-se aumento nos valores de recuperação da biomolécula na fase diluída, com valores de $Y_{\text{clavd}} = 35 \pm 6\%$ e $41 \pm 2\%$, respectivamente. Entretanto, verifica-se que não houve variação significativa na recuperação da biomolécula na fase concentrada em micelas nestes sistemas, com valores em torno de $Y_{\text{clavc}} = 45\%$, independente do R e da presença do sulfato de amônio nos sistemas.

6. CONCLUSÃO

A partir do estudo de estabilidade do ácido clavulânico frente ao pH e temperatura, demonstrou-se que o fármaco apresenta maior estabilidade no pH 6,5 e em temperaturas mais baixas em torno de 5 °C a 20 °C. A avaliação da estabilidade em relação à presença do sulfato de amônio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ em diferentes concentrações mostrou que o sal afetou a estabilidade da biomolécula, sendo que para os períodos de tempo mais longos (24h) não houve diferença muito significativa na estabilidade do ácido clavulânico em relação à concentração de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Nos estudos de estabilidade frente ao polímero sulfato de dextrana (Dx-S), verificou-se que a adição de polímero acarretou em menor perda da estabilidade do ácido clavulânico quando comparado ao $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, sendo que, a porcentagem do ácido clavulânico residual apresentou-se superior a 90% a 35 °C, no tempo de 6 horas. Assim como observado nos estudos de estabilidade do ácido clavulânico frente ao $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, também pode-se concluir que a concentração do polímero não influenciou a estabilidade do fármaco na faixa estudada, mas sim a presença deste. Em relação à presença de Triton X-114 e Triton X-100, o ácido clavulânico apresentou-se estável frente à ambos os tensoativos nas concentrações analisadas, sendo seu valor residual de aproximadamente 100%.

O estudo do comportamento dos sistemas Triton X-114/tampão e Triton X-100/tampão mostrou que as curvas binodais obtidas estão de acordo com a literatura, ambas com concavidade para cima, e com o ponto de névoa em torno de $T_{\text{névoa}} = 25,7 \text{ °C}$ e $65,0 \text{ °C}$, respectivamente. Como esperado, com a adição do $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ em ambos os sistemas foi verificada uma diminuição da temperatura de $T_{\text{névoa}}$ devido ao efeito cosmotrópico do sal. Na presença do polímero sulfato de dextrana (Dx-S), um eletrólito mais fraco, verificou-se menor redução do $T_{\text{névoa}}$ dos sistemas Triton X-114 e Triton X-100/polímero quando comparado ao sal.

De acordo com os ensaios de partição, o ácido clavulânico migrou preferencialmente para a fase diluída, isto é pobre em micelas em todas as condições estudadas, tanto nos sistemas Triton X-114/tampão quanto Triton X-100/tampão, com valores de $(K_{\text{AC}} \sim 0,7)$. O mesmo comportamento foi verificado para os sistemas na presença de sal, e, portanto, o potencial eletrostático não foi suficiente para influenciar a partição do ácido clavulânico. Nos sistemas na presença do polímero, somente em concentrações mais altas ($\geq 8,0\%$ p/p) o sulfato de

dextrana proporcionou aumento nos valores de K_{AC} , devido à repulsão eletrostática do ácido clavulânico para a fase micelar, porém com valores ainda próximos a 1 - 1,5.

Portanto, os resultados demonstraram que a presença dos aditivos não influenciou a partição do ácido clavulânico para a fase micelar, e com isso os sistemas Triton X-114/tampão e Triton X-100/tampão demonstraram ser eficientes para a recuperação do ácido clavulânico na fase pobre em micelas, o que pode ser considerado promissor, já que a purificação por cromatografia ou adsorção, passo subsequente à extração por SMDFA, se torna mais fácil na ausência de qualquer tensoativo ou na presença de menores concentrações destes.

Como perspectiva futura, novas condições podem ser estudadas a fim de se aumentar a recuperação do fármaco na fase diluída dos sistemas, visando à remoção de proteínas contaminantes de homogeneizados celulares por desnaturação prévia das mesmas e consequente partição para a fase oposta (micelar).

REFERÊNCIAS

ALBERTSSON, P.A. **Partition of cell particles and macromolecules**. 3.ed. New York: Wiley- Interscience, 1986, 346p.

ANVISA, AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/hotsite/genéricos/listas/registrados.htm>>. Acesso em: outubro, 2009.

ALCARAZ, G., KINET, J.P., KUMARQ, N., WANKLI, S.A., METZGER, H. Phase Separation of the Receptor for Immunoglobulin E and Its Subunits in Triton X- 114. **The Journal of biological chemistry**, v. 259, n. 23, p. 14922-14927, 1984.

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

AMID, M.; SHUHAIMI, M.; SARKER, M.Z.I.; MANAP, M.Y.A. Purification of serine protease from mango (*Mangifera Indica* Cv. *Chokanan*) peel using an alcohol/salt aqueous two phase system. **Food Chemistry**, v. 132, p. 1382–1386, 2012.

ANDRADE, E.G.A.; SILVA, M.S.C.; HAGA, R.B.; SANTOS, V.C.; PESSOA-JR, A.; RANGEL-YAGUI. Extraction of clavulanic acid using aqueous two-phase micellar system. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 58, n. 2, p. 103-108, 2011.

ATTWOOD, D.; FLORENCE, A.T. **Princípios Físico-Químicos em Farmácia**. 3.ed. Brasil: Editora da Universidade de São Paulo, p. 311-327, 2003.

BAGGALEY, K.H., BROWN, AG.; SCHOFIELD, C.J. Chemistry and biosynthesis of clavulanic acid and others clavams. **Natural Products Reporter**, 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.

BESEL, E; BAKIR, U. **Use of Triton X-114 aqueous two phase system for recovery of mushroom (*Agaricus bisporus*) polyphenoloxidase**. 2003. 85 f. (Master's Dissertation) - The Middle East Technical University, Turkey, 2003.

BETHEL C. R.; HUJER A. M.; HELFAND M. S.; BONOMO R. Exploring the effectiveness of tazobactam against ceftazidime resistant *Escherichia coli*: insights from the comparison between susceptibility testing and β -lactamase inhibition. **FEMS Microbiology Letters**, v. 234, p. 99-103, 2004.

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, n. 12, p. 7268-7288, 1986.

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

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

BOX, S. J. **Preparation of clavulanic using *Streptomyces jumonjinensis***. Beecham Group Ltda. US Patent 4072569, 1978.

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.; HIRATA, D. B.; PASOTTO, M. B.; HOKKA, C. O. Clavulanic acid extraction from cultivation médium by organic solvent and aqueous two phase system. In: **Anais XX Congresso Mercosul de Engenharia Química (EMPROMER)**, Costa Verde, Brasil, 2005.

BROWN, A. G.; BUTTERWORTH, D.; COLE, M.; HANSCOMB, G.; HOOD, J.D.;READING, C.; ROINSON, G. N. Naturally occurring β -lactamase inhibitors with antibacterial activity. **The Journal of Antibiotics**, v. 29, n. 6, p. 668-669, 1976.

BUTLER, M.S.; BUSS, A.D. Natural produts – The future scaffolds for novel antibiotics? **Biochemical Pharmacology**, v. 71, p. 919-929, 2006.

BUTTERWORTH, D. Clavulanic acid: properties, biosynthesis and fermentation. **Biotechnology of Industrial Antibiotics**, p. 225-235, 1984.

CALLEWAERT, G. L. **Clavulanic Acid Salts**. Spurcourt Limited. US Patent 5786351, 1998.

CARALE, M. T. R. **Salt effects on micellization, micellar growth, and phase behavior of aqueous solution of nonionic surfactants**. 1993. 189 f. (Ph. D. Thesis) – Massachusetts Institute of Technology, Massachusetts, 1993.

CAPUDER, E. **Preparation of clavulanate salts**. Lek Pharmaceutical & Chemical CO.DD. US Patent 6180782, 1998.

CAPUDER, E. **Novel process for the isolation of clavulanic acid and of pharmaceutically acceptable salts thereof**. US Patent 0007761, 2001.

CAPUDER, E. **Process for the isolation of clavulanic acid and of pharmaceutically acceptable salts thereof from the fermentation broth of *Streptomyces* sp.** Lek Pharmaceutical & Chemical CO.DD. US Patent 5780274, 1998.

CHALLIS, G.L.; HOPWOOD, D. A. Synergy and contingency as driving forces for the evolution of multiple secondary metabolite production by *Streptomyces* sp. **The National Academy of Sciences of 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.

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

CHIARINI, E.; PENNA, T.C.V. Extração, purificação e caracterização físico-química da proteína verde fluorescente recombinante (GFPuv) expressa em *Escherichia coli*. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 39, n. 4, p. 457-466, 2003.

CHITHRA, C.; DEVARAJ, H. Purification and characterisation of a 48 kDa protein involved in the molting cycle of *Penaeus monodon*. **Food Chemistry**, v. 134, p. 15–20, 2012.

CITAK, D.; TUZEN, M. A novel preconcentration procedure using cloud point extraction for determination of lead, cobalt and copper in water and food samples using flame atomic absorption spectrometry. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, p. 1399–1404, 2010.

COLE, M.; HOWARTH, T. T.; READING, C.; **Novel β -lactam antibiotic from *Streptomyces clavuligerus***. SmithKline Beecham Corporation. GB Patent 1508977, 1978.

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.

COSTA, S.A., PESSOA, JR. A., ROBERTO, I.C. Partitioning of xylanolytic complex from *Penicillium janthinellum* by an aqueous two-phase system. **Journal of Chromatography B**, v. 743, p. 339-348, 2000.

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.

DATSKEVICH, P.N.; MYMRIKOV, E.V.; SLUCHANKO, A. SHEMETOV, A.A. SUDNISTSYNA, M.V.; GUSEV, N.B. Expression, purification and some properties of fluorescent chimeras of human small heat shock proteins. **Protein Expression and Purification**, v. 82, p. 45–54, 2012.

DE LA FUENTE, J. L.; MARTÍN, J. F.; LIRAS, P. New type of hexameric ornithine carbamoyltransferase with aeginase activity in the cephamycin producers streptomyces clavuligerus and nocardia lactamdurans. **Biochemical Journal**, v. 320, p. 173, 1996.

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.

DENNISON, C.; LOVRIEN, R. Three Phase Partitioning: Concentration and Purification of Proteins. **Protein Expression and Purification**, v. 11, p. 149–161, 1997.

DIDI, M.A.; SEKKALA, A.R.; VILLEMIND, D. Cloud-point extraction of bismuth (III) with nonionic surfactants in aqueous solutions. **Colloids and Surfaces A: Physicochemistry Engineering Aspects**, v. 375, p. 169–177, 2011.

DURUKAN, I.; SAHIN, Ç.A.; SATIROGLU, N.; BEKTAS, S. Determination of iron and copper in food samples by flow injection cloud point extraction flame atomic absorption spectrometry. **Microchemical Journal**, v. 99, p. 159–163, 2011.

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

ENSIGN, J.C. Formation, properties, and germination of actinomycete spores. **Annual review of Microbiology**, v. 32, p. 185-219, 1978.

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

FINN, M. J.; HARRIS, M. A.; HUNT, E.; ZOMAYA, I. I.; Studies on the hydrolysis of clavulanic acid. **Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions I**, v. 1, p. 1345-1349, 1984.

FLARDH, K. Growth polarity and cell division in *Streptomyces*. **Current Opinion in Microbiology**, v. 6, n. 6, p. 564-571, 2003.

FLEMING, I. D.; NOBLE, D.; WALL, W. F. **β-lactam antibiotic in purified form**. Glaxo Laboratories Limited. GB Patent 1543563, 1979.

FLEMING, I. D.; NOBLE, D.; WALL, W. F. **Pure potassium salt of clavulanic acid**. Glaxo Laboratories Limited. US Patent 4367175, 1983.

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

GALATANU, A.N.; CHRONAKIS, I.S.; ANGHEL, D.F.; KHAN, A. Ternary Phase Diagram of the Triton X-100/Poly(acrylic acid)/Water System. **Langmuir**, v. 16, p. 4922-4928, 2000.

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 derivates. **World Journal of Microbiology Biotechnology**, v. 15, p. 623-627, 1999.

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.

HADDOU, B.; GUITRI, N.; DEBBAD, A.; GOURDON, C.; DERRICHE, Z. Cloud Point Extraction of Orange II and Orange G Using Neutral and Mixed Micelles: Comparative Approach Using Experimental Design. **Separation Science and Technology**, v. 46, n. 5, p. 734-743, 2011.

HAMAD, B. The antibiotics market. **Nature Reviews/Drug Discovery**, v. 9, p. 675-676, 2010.

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

HARDISSON, C.; MANZANAL, M.B.; SALAS, J.A.; SUAREZ, J.E. Fine structure, physiology and biochemistry of arthrospore germination in *Streptomyces antibioticus*. **Journal of General Microbiology**, v. 105, n. 2, p. 203-214, 1978.

HARVEY, A. Strategies for discovering drug from previously unexplored natural products. **Drug Discovery Today**, v. 5, p. 294-300, 2000.

HEMAVATHI, A.B.; RAGHAVAROA, K.S.M.S. Differential partitioning of β galactosidase and β -glucosidase using aqueous two phase extraction. **Process Biochemistry**, v. 46, p. 649-655, 2011.

HIRATA, D. B.; OLIVEIRA, J. H. H. L.; LEÃO, K. V.; RODRIGUES, M. I.; FERREIRA, A. G.; GIULIETTI, M.; BARBOZA, M.; HOKKA, C. O.; Precipitation of Clavulanic Acid from Fermentation Broth with Potassium 2-Ethylhexanoate Salt. **Separation Purification Technology**, v. 66, p. 598-605, 2009.

HOKKA, C. O.; ARAUJO, M.L.G.C.; PASOTTO, M.B.; BADINO, A.C. Produção de Antibióticos Beta-Lactâmicos por *Streptomyces* sp. em Escala de Bancada. **Revista Racine Fármacos & Medicamentos**, v. 47, p. 1-3, 2010.

HOWARTH T.T., BROWN A.G., KING T.J. Clavulanic acid, a novel β -lactam isolated from *Streptomyces clavuligerus* – X-ray crystal-structure analysis. **Journal of the Chemical Society- Chemical Communications**, v. 7, p. 266-276, 1976.

ISRAELACHVILI, J. N. **Intermolecular and surface forces**, 2.ed. London: Academic Press, 1992, 450p.

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 Polymer Science**, v. 285, p. 631-640, 2007.

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.

KABIR-UD-DIN; KHATOON, S.; NAQVI, A.Z. The Effect of Added Salts and Organics on the Cloud Point of TX-114. **Journal of Dispersion Science and Technology**, v. 29, p. 485–491, 2008.

KAMEI, D.T., WANG, D.I.C., BLANKSCHTEIN, D. Fundamental investigation of protein partitioning in two-phase aqueous mixed (nonionic/ionic) micellar systems. **Langmuir**, v. 18, n. 8, p. 3047-3057, 2002.

KIM, J. K.; CHOI, N. H.; CHOI, G. S.; LEE, D. **Process for manufacturing clavulanic acid salt**. WO Patent 34194, 1995.

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

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

KOSHY, L.; SAIYAD, A. H.; RAKSHIT, A. K.; The effects of various foreign substances on the cloud point of Triton X-100 e Triton X-114. **Colloid Polymer Science**, v. 274: 582-587, 1996.

KUKUSAMUDE, C.; SANTALAD, A.; BOONCHIANGMA, S.; BURAKHAM, R.; SRIJARANAI, S.; CHAILAPAKUL, O. Mixed micelle-cloud point extraction for the analysis of penicillin residues in bovine milk by high performance liquid chromatography. **Talanta**, v. 81, p. 486–492, 2010.

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**. New York, Springer-Verlag, 1981.

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

LIU, C.L.; NIKAS, Y.J.; BLANKSCHTEIN, D. Partitioning of proteins using two-phase aqueous surfactants systems. **AIChE Journal**, v. 41, p. 991-995, 1995.

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-aqueous micellar systems. **Journal of Chromatography B**, v. 711, 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**. 2006. 135f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Bioquímica Farmacêutica), Universidade de São Paulo, 2006.

LOPES, A.M.; MAGALHÃES, P.O.; MAZZOLA, P.G.; RANGEL-YAGUI, C.O.; CARVALHO, J.C.M.C; PENNA, T.C.V.; PESSOA-JR A. LPS Removal from an *E. Coli* Fermentation Broth Using Aqueous Two-Phase Micellar System. **Biotechnology Progress**, v. 26, n. 6, p. 1644-1653, 2010.

MA, R.; ZHAO, J.; Du, H.C.; TIAN, S.; LI, W.L. Removing endotoxin from plasmid samples by Triton X-114 isothermal extraction. **Analytical Biochemistry**, v. 424, p. 124-126, 2012.

MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; PARKER, J. **Brock Biology of microorganisms**. 8.ed. Uppler Saddle River: Prentice Halls, p. 442-445, 1997.

MADEIRA, P. P.; TEIXEIRA, J. A.; MACEDO, E. A.; MIKHEEVA, L.; ZASLAVSKY, Y. "On the Collander equation": Protein partitioning in polymer/polymer aqueous two-phase systems. **Journal of Chromatography A**, v. 1190, p. 39-43, 2008.

MARANESI, G. L.; BAPTISTA NETO, A.; HOKKA, C. O.; BADINO, A.C. Utilization 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.

MAZZOLA, P.G; LOPES, A.M.; HASMAN, F.A.; JOZALA. A.F.; PENNA, T.C.V.; MAGALHAES, P.O.; RANGEL-YAGUI, C.O.; PESSOA, A, Jr., Liquid-liquid extraction of biomolecules: an overview and update of the main techniques. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 83, p. 143-157, 2008.

MAYER, A.F.; DECKWER, W.D., Simultaneous production and decomposition of clavulanic acid during *Streptomyces clavuligerus* cultivations. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.45, 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.

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

MEHLING, T.; INGRAM, T.; SMIRNOVA, I. Experimental Methods and Prediction with COSMO-RS to Determine Partition Coefficients in Complex Surfactant Systems. **Langmuir**, v. 28, p. 118-124, 2012.

METIVIER, A.; BOYAVAL, P.; DUFFLES, F. DOUSSET, X.; COMPOINT, J.P.; MARION, D. Triton X-114 phase partitioning for the isolation of a pediocinlike bacteriocin from *Carnobacterium divergens*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 30, p. 42-46, 2000.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/renome_medicamentos_essenciais.pdf>. Acesso em: setembro, 2009.

MITCHELL, D.J. Phase behavior of polyoxyethylene surfactants with water. **Journal of Chemical Society Faraday Transactions 1**, v. 79, p. 975-1000, 1983.

MOHAMMADI, S.Z.; AFZALIB, D.; POURTABELIA, D. Flame Atomic Absorption Spectrometric Determination of Trace Amounts of Palladium, Gold and Nickel after

Cloud Point Extraction. **Journal of Analytical Chemistry**, v. 66, n. 7, p. 620–625, 2011.

MORITA, T.; ASSUMPÇÃO, R.M.V. Manual de soluções, reagentes e solventes “padronização – preparação – purificação”. 2 ed. Editora Edgard Blucher Ltda, 2007.

MUSTAFINA, A.R.; ELISTRATOVA, J.G.; BOCHKOVA, O.D.; BURILOV, V.A.; FEDORENKO, S.V.; KONOVALOV, I.; SOLEVEVA, S.Y. Temperature induced phase separation of luminescent silica nanoparticles in Triton X-100 solutions. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 354, p. 644–649, 2011.

NABAIS, A. M. A.; CARDOSO, J. P. Ultrafiltration of Fermented Broths and Solvent Extraction of Antibiotics. **Bioprocess Engineering**, v.13, p. 215-221, 1995.

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.

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

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.

NAZAR, M.F.; SHAH, S.S.; EASTOE, J.; KHAN, A.M.; SHAH, A. Separation and recycling of nanoparticles using cloud point extraction with non-ionic surfactant mixtures. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 363, p. 490–496, 2011.

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.

NIOI, C.; KAPEL, R.; RONDAGS, E.; MARC, I. Selective extraction, structural characterisation and antifungal activity assessment of napins from an industrial rapeseed meal. **Food Chemistry**, v. 134, p. 2149–2155, 2012.

OLIVEIRA, P. M. S. **Seleção de *Streptomyces spp* produtores de inibidores de beta lactamases**. 2004. 58 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade do Pernambuco, Pernambuco, 2004.

OLIVEIRA, J.H.H.L.; GRANATO, A.C.; HIRATA, D.B.; HOKKA, C.O.; BARBOZA, M. Ácido clavulânico e cefamicina C: Uma perspectiva da biossíntese, processos de isolamento e mecanismos de ação. **Química Nova**, v. 32, n. 8, p.2142-2150, 2009

ORTIZ, S. C. A., **Estudo da produção de ácido clavulânico por streptomyces clavuligerus em diferentes concentrações de Lipídeos e de Fontes Complexas de nitrogênio**. 2005. 88 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal de São Carlos, São Paulo, 2005.

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.

PATRICK, G. L. **An Introduction to Medicinal Chemistry**. 4.ed. Oxford University Press: Oxford, 752p, 2008.

PAYNE, D. J.; CRAMP, R.; WINSTANLEY, D. J.; KNOWLES, D. J. C.; Comparative activities of clavulanic acid, sulbactam and tazobactam against clinically important beta-lactamases. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 38, n. 4, p. 767-772, 1994.

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

PEREIRA, J. F.B; SANTOS, V.C.; JOHANSSON, H.O.; TEIXEIRA, J.A.C.; PESSOA-Jr, A. Application of polymeric two phase system made of poly(ethylene glycol (PEG) and sodium poly(acrylate) (NaPA) in the presence of NaCl for clavulanic acid extraction. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.44, 2008, 22p.

PITLOVANCIV, A. K. **Atividade antibiótica de extratos obtidos de culturas de *Chromobacterium violaceum***. 2005. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal de Santa Catarina, Santa Catarina, 2005.

PORTO, T. **Extração da ascorbato oxidase de *Cucurbita maxima* por processo descontínuo e contínuo em coluna de discos rotativos perfurados utilizando sistemas de duas fases aquosas**. 2008. 123 f. Dissertação (Doutorado em Tecnologia Químico-Farmacêutica) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

POURREZA, N.; RASTEGARZADEH, S.; LARKI, A. Determination of Allura red in food samples after cloud point extraction using mixed micelles. **Food Chemistry**, v. 126, p. 465–469, 2011.

PURKAIT, M.K.; DASGUPTA, S.; DE, S. Performance of TX-100 and TX-114 for the separation of chrysoidine dye using cloud point extraction. **Journal of Hazardous Materials B**, v. 137, p. 827–835, 2006.

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.

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., 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.

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

REFFAS H.; BENABDALLAH, T.; YUCEF, M.H.; ILIKTI, H. Study on the Cloud Point Extraction of Copper(II) from an Aqueous Sulfate Medium with *N,N'*-Bis(salicylideneaminoethyl)amine Polydentate Schiff Base into a Nonionic Surfactant Phase. **Journal of Chemical Engineering**, v. 55, p. 912-918, 2010.

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

ROMERO, J.; LIRAS, P.; MARTIN, J. F. Utilization of ornithine and arginine as specific precursors of clavulanic acid. **Applied Environmental Microbiology**, v. 52, n. 4, p. 892-897, 1986.

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.

SALOWE, S. P.; MARSH, E. N.; TOWNSAND, C. A. Purification and Characterization of clavamate synthase from *Streptomyces clavuligerus* – an unusual oxidative enzyme in natural product biosynthesis. **Biochemistry**, v. 29, p. 6499-6508, 1990.

SALVARANI, F.M., PINTO F.F., LOBATO, F.C.F, GONÇALVES, R.A.A.L.A., CLEMENTINO N.E.M.I.J., COSTA A.T.R. Minimum inhibitory concentration of eight antibiotics toward isolates of *streptococcus suis*. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, Brazil, v. 45, n. 1, p. 41-47, 2008.

SANTOS, V.C.; PEREIRA, J.F.B; HAGA, R.B.; RANGEL-YAGUI, C.O.; TEIXEIRA, J.A.C.; CONVERTI, A.; PESSOA, A, Jr. Stability of clavulanic acid under variable pH, ionic strength and temperature conditions. A new kinetic approach. **Biochemical Engineering Journal**, v. 45, n. 2, p. 89-93, 2009.

SANTOS, V.C.; HASMANN, F.A.; CONVERTI, A.; PESSOA-JR, A. Liquid-liquid extraction by mixed micellar systems: A new approach for clavulanic acid recovery from fermented broth. **Biochemical Engineering Journal**, v. 56, p. 75–83, 2011.

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

SILVA, M.A.O.S. **Avaliação e caracterização de sistemas baseados em ponto de nuvem visando à remoção de albumina do plasma sanguíneo**. 2008. 138 f. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) - Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 2008.

SILVA, M.A.O.S.; ARRUDA, M.A.Z. An aqueous two-phase system as a strategy for serum albumin depletion. **Talanta**, v. 77, p. 985-990, 2009.

SILVA, S.C.; BOVAROTTI, E.; RODRIGUES, M.I., HOKKA, C.O.; BARBOZA, M. Evaluation of the effects of the parameters involved in the purification of clavulanic acid from fermentation broth by aqueous two-phase systems. **Bioprocess Biosystems Engineering**, v. 32, p. 635-632, 2009.

SILVÉRIO, S. C.; FERREIRA, L. A.; MARTINS, J. A.; MARCOS, J. C.; MACEDO, E. A.; TEIXEIRA, J. A. Lysozyme and bovine serum albumin partitioning in polyethylene glycol–phenylalanine conjugate polymer/salt aqueous two phase systems. **Fluid Phase Equilibria**, v. 322-323, p.19-25, 2012.

SIMON, R. **Clavulanic Acid Extraction Process**. Smithkline, Beecham P. L. C. US Patent 6172221, 2001.

SIVARS, U., BERGFELDT, K., PICULELL, TJERNELD, F., Protein partitioning in weakly charged polymer-surfactant aqueous two-phase systems, **Journal of Chromatography B**, v. 680, p. 43-53, 1996.

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

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.

TANFORD, C. **The hydrophobic effect: Formation of micelles and biological membranes**. New York: Wiley, 1980.

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

TANI, H.; SAITOH, T.; KAMIDATE, T.; KAMATAKI, T. WATANABE, H. Polymer-Induced Phase Separation in Aqueous Micellar Solutions of Octyl-b-D-Thioglucoside for Extraction of Membrane Proteins. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 56, n. 3, p. 311-318, 1997.

TOWNSEND, B. C. A.; HO, M.; J. Biosynthesis of clavulanic acid – Origin of the C-5 unit. **Journal of American Chemical Society**, v. 107, n. 4, p. 1065-1066, 1985.

ULUSOY, H.I.; GURKAN, R.; AKSOY, U.; AKÇAY, M. Development of a cloud point extraction and preconcentration method for determination of trace aluminum in mineral waters by FAAS. **Microchemical Journal**, v. 99, p. 76–81, 2011.

VALENTINE, B. P.; BAILEY, C. R.; DOHERTY, A.; MORRIS, J.; ELSON, S. W.; BAGGALEY, K. H.; NICHOLSON, N. H.; J. 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**, p. 1210, 1993.

VIDEIRA, M.; AIRES-BARROS, M.R. Liquid-liquid extraction of clavulanic acid two-phase system of polyethylene glycol phosphate using an aqueous and potassium. **Journal of Chromatography A**, v. 668, p. 237-240, 1994.

XIE, H.G.; WANG, Y.J; SUN, M. Modeling of the partitioning of membrane protein and phase equilibria for Triton X-100–salt aqueous two-phase systems using a modified generalized multicomponent osmotic virial equation. **Process Biochemistry**, v. 41, p. 689–696, 2006.

WALSH, C., **Antibiotics: Actions, Origins, Resistance**. 1.ed: ASM Press, p. 3, 4, 89, 108, 114, 2003.

WANG, T.; GAO, X.; TONG, J.; CHEN, L. Determination of formaldehyde in beer based on cloud point extraction using 2,4-dinitrophenylhydrazine as derivative reagent. **Food Chemistry**, v. 131, p. 1577–1582, 2012.

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

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

WU, X.; LIANG, L.; ZOU, Y.; ZHAO, T.; ZHAO, J. LI, FANG; YANG, L. Aqueous two-phase extraction, identification and antioxidant activity of anthocyanins from mulberry (*Morus atropurpurea* Roxb.). **Food Chemistry**, v. 129, p. 443–453, 2011.

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.

YILDIZ, Z.; ARSLAN, G.; TOR, A. Preconcentrative separation of chromium(III) species from chromium (VI) by cloud point extraction and determination by flame atomic absorption spectrometry. **Microchimica Acta**, v. 17, p. 399–405, 2011.

ZENG, X.; ASARE, K.O. Partitioning behavior of silica in the Triton X-100/dextran/water aqueous biphasic system. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 272, p. 298–307, 2004.

ZHOU, J.; CHEN, J.; CHENG, Y. LI, D., HU, F.; LI, H. Determination of Prometryne in water and soil by HPLC–UV using cloud-point extraction. **Talanta**, v. 79, p. 189–193, 2009.

ZHONG, S.; TAN, S.N.; GE, L.; WANG, W.; CHEN, J. Determination of bisphenol A and naphthols in river water samples by capillary zone electrophoresis after cloud point extraction. **Talanta**, v. 85, p. 488–492, 2011.

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.; MICHEL, H. Crystallization of membrane proteins. **CRC Press**, p. 53-72, 1991.

ANEXO I

Curva padrão da absorbância em função da concentração de ácido clavulânico (mg/L) (99% pureza) em espectrofotômetro Hitachi U-1900 obtida experimentalmente.

ANEXO II

Curva padrão da absorvância em função da concentração de Triton X-114 (mg/mL) em espectrofotômetro Hitachi U-1900 obtida experimentalmente.

Curva padrão da absorvância em função da concentração de Triton X-100 (mg/mL) em espectrofotômetro Hitachi U-1900 obtida experimentalmente.