

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “Júlio de Mesquita Filho”  
INSTITUTO DE QUÍMICA DE ARARAQUARA**

# **ESTUDOS DE ADSORÇÃO DO ÁCIDO CLAVULÂNICO**

*Mestranda:* Patrícia Alessandra Bersanetti  
*Orientadora:* Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Maria Lucia G. C. Araujo

Dissertação de Mestrado apresentada ao  
Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia,  
Área de Concentração: Biotecnologia.

**ARARAQUARA - SP  
2001**

# **DADOS CURRICULARES**

**Patrícia Alessandra Bersanetti**

## **1. DADOS PESSOAIS**

- 1.1. Nascimento : 31/12/1975
- 1.2. Nacionalidade : Brasileira
- 1.3. Naturalidade : Araraquara – SP
- 1.4. Estado Civil : Solteira
- 1.5. Filiação : José Carlos Bersanetti  
Heloisa Maria Cazeto Bersanetti
- 1.6. Profissão : Química Tecnológica
- 1.7. Documento de Identidade: 26878280-5
- 1.8. Cadastro de Pessoa Física: 178651788-40
- 1.9. Endereço: Av. Dom Pedro II, n.1725, Araraquara-SP, CEP:14801-040

## **2. FORMAÇÃO ACADÊMICA**

- 2.1. Bacharel em Química Tecnológica,  
Concluído em 14/12/1998 no Instituto de Química de Araraquara - UNESP.
- 2.2. Mestrado em Biotecnologia  
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Área de Concentração:  
Biotecnologia, concluído em 29/03/2001, pelo Instituto de Química de  
Araraquara - UNESP.

## **3. TRABALHOS CIENTÍFICOS PUBLICADOS**

- 3.1. Bersanetti, P.A.; Barboza, M.; Hokka, C.O.; Araujo, M.L.G.C. Estudos cinéticos de hidrólise do ácido clavulânico. Trabalho apresentando no XIII Simpósio Nacional de Fermentações (SINAFERM) em agosto/2000 e disponível em CDROM.

#### **4. TRABALHOS CIENTÍFICOS SUBMETIDOS À PUBLICAÇÃO**

- 4.1. Bersanetti, P.A.; Barboza, M.; Hokka, C.O.; Araujo, M.L.G.C. Kinetic studies on the clavulanic acid hydrolysis. Trabalho submetido à publicação no Brazilian Journal of Chemical Engineering.

Dedico...

...À Deus, por ter-me dado forças para vencer os obstáculos, por ter-me feito forte, não permitindo que o cansaço me dominasse e, se consegui atingir esse ideal, mais do que a tudo, devo ao Senhor.

...Aos meus pais José Carlos e Heloisa, pelo carinho, incentivo e dedicação ao longo de todos esses anos. “A vocês que me deram a vida e me ensinaram a vivê-la com dignidade... A vocês que me iluminaram os caminhos obscuros, para que eu os trilhasse sem medo e cheia de esperanças... A vocês que se doaram inteiros e renunciaram aos seus sonhos para que muitas vezes eu pudesse realizar os meus, não bastaria um muitíssimo obrigada.”

...Ao meu namorado Aitor, pelo carinho, apoio, compreensão e principalmente pelo amor. “A tua presença é qualquer coisa como a luz e a vida e eu sinto que em meu gesto existe o teu gesto e em minha voz a tua voz.”

...À minha orientadora Maria Lucia, pelos ensinamentos, dedicação, paciência e acima de tudo pela amizade. “Ser mestre não é apenas transmitir a matéria. Ser mestre é ser instrutor e amigo, guia e companheiro. Ser mestre é ser exemplo de dedicação, doação, dignidade pessoal e sobretudo de amor”. A você, Maria Lucia que soube ser tudo isso, o meu muito obrigada.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Prof. Dr. Carlos Osamu Hokka pela orientação, incentivo, apoio e ensinamentos.

Aos amigos do Departamento de Engenharia Química da UFSCar, em especial ao Marlei Barboza pela colaboração.

Ao Prof. Dr. Pedro Luis Onofrio Volpe e ao Ricardo do Instituto de Química da Unicamp pela atenção e colaboração na realização desse trabalho.

Aos amigos do Departamento de Bioquímica e Tecnologia Química, especialmente a Susana, Eliane, Telma, Maria Benincasa, Marcela e Guilherme, pela convivência e amizade durante estes dois anos.

Aos funcionários do Departamento de Bioquímica e Tecnologia Química, especialmente a Maria do Carmo e a Luisa pelo apoio.

Às amigas Andreia Morandim, Ana Maria Veronezi e Claudia Torres pela convivência e acima de tudo pela amizade.

Às funcionárias da seção de pós-graduação: Izolina, Vilma e Sandra e às funcionárias da biblioteca: Valéria, Priscila e Cristiane, que sempre gentilmente me atenderam.

Aos professores deste Instituto que contribuíram para minha formação pessoal e profissional.

A Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa da UNESP pelo auxílio financeiro para participação em congresso.

A CAPES pela bolsa concedida.



## RESUMO

O ácido clavulânico é um metabólito secundário isolado de culturas de *Streptomyces clavuligerus* que possui uma atividade antibacteriana fraca, mas é um potente inibidor de  $\beta$ -lactamases. O uso combinado desse composto com penicilinas e cefalosporinas tem se mostrado uma estratégia terapêutica eficiente na luta contra a resistência bacteriana.

Esse composto  $\beta$ -lactâmico é produzido por fermentação simultaneamente com outros intermediários metabólicos e sua purificação envolve uma série de etapas, que incluem: adsorção, troca-iônica, extração líquido-líquido, precipitação e cristalização.

O objetivo deste trabalho foi a investigação da eficiência de diferentes resinas na purificação do ácido clavulânico por adsorção e troca-iônica. No entanto, como esse composto  $\beta$ -lactâmico apresenta velocidades de degradação elevadas em soluções aquosas, inicialmente estabeleceu-se a faixa de pH de maior estabilidade, situada entre 4,5 e 7,5.

Os estudos cinéticos de adsorção em batelada mostraram que somente a resina de troca iônica IRA400 foi eficiente na recuperação do ácido clavulânico, a partir de soluções aquosas. Assim, analisou-se a influência de parâmetros como temperatura, concentração de resina, força iônica e pH no processo de troca-iônica. A caracterização termodinâmica do processo foi possível através da determinação da entalpia de adsorção por microcalorimetria e da afinidade da resina pelo composto em questão.

Esses estudos foram importantes para o estabelecimento das melhores condições de adsorção que podem ser empregadas na purificação do ácido clavulânico a partir do caldo fermentativo.

## ABSTRACT

Clavulanic acid is a secondary metabolite isolated from cultures of *Streptomyces clavuligerus* and presents a low antibacterial activity but is a potent inhibitor of  $\beta$ -lactamases. Its use in combination with penicillins and cephalosporins has shown to be an efficient therapeutic strategy to face bacterial resistance to antibiotics.

This  $\beta$ -lactam compound is produced by fermentation simultaneously with other metabolic intermediates and its purification involves several steps: liquid-liquid extraction, adsorption, ion-exchange chromatography, precipitation and crystallization.

In this work the performance of several resins for the purification of clavulanic acid by adsorption and ion-exchange chromatography was investigated. However, since this  $\beta$ -lactam compound presents high degradation rates in aqueous solution, initially the pH range leading to higher stability was determined.

The adsorption studies, performed batchwise, has shown that only the Amberlite IRA400 ion exchange resin was effective for the recovery of the clavulanic acid in aqueous solutions. Then, the influence of temperature, resin concentration, ionic strength and pH in the ion exchange process was analyzed. Thermodynamic characterization of the process was achieved by the determination of the adsorption enthalpy in a microcalorimetry and by the resin affinity the target compound.

This studies were essential for the establishment of the best adsorption conditions which could be applied for the clavulanic acid purification from the fermentation broth.

## NOMENCLATURA

A	Área superficial do adsorvente ( $m^2/g$ )
C	Concentração de ácido clavulânico em solução no tempo t (mg/L)
$C_{ads}$	Concentração de ácido clavulânico adsorvida no tempo t (mg/L)
$C_{ads}^*$	Concentração de ácido clavulânico adsorvida no equilíbrio (mg/L)
$C_0$	Concentração inicial de ácido clavulânico (mg/L)
$C_{desorv}$	Concentração de ácido clavulânico desorvida no tempo t (mg/L)
$C_i$	Concentração iônica (mol/L)
$C_{res}$	Concentração de resina (g/L)
$m_{ac}$	Massa de ácido clavulânico (mg)
$m_{res}$	Massa de resina (g)
H	Entalpia (KJ/mol)
k	Constante de velocidade global de hidrólise ( $h^{-1}$ )
$k_1$	Constante de velocidade de adsorção em condições de adsorção ( $h^{-1}$ )
$k'_1$	Constante de velocidade de adsorção aparente em condições de adsorção ( $h^{-1}$ )
$k_2$	Constante de velocidade de desorção em condições de adsorção ( $h^{-1}$ )
$k_3$	Constante de velocidade de desorção em condições de desorção ( $h^{-1}$ )
$k_4$	Constante de velocidade de adsorção em condições de desorção ( $h^{-1}$ )
$K_{ads}$	Constante de equilíbrio de adsorção
$K_{des}$	Constante de equilíbrio de desorção
q	Massa de ácido clavulânico adsorvida por unidade de adsorvente (mg/g)
$q_{max}$	Massa de ácido clavulânico máxima adsorvida por unidade de adsorvente (mg/g)
Q	Quantidade de calor liberada ou absorvida num processo (J)
t	Tempo (min; h)
$t_{1/2}$	Tempo de meia vida (h)
T	Temperatura ( $^{\circ}C$ )
z	Carga do íon
$\alpha$	Afinidade da resina pelo ácido clavulânico ( $L/m^2$ )
$\mu$	Força iônica do meio (mol/L)

# SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>3</b>
<b>2.1. Antibióticos e metabolismo secundário</b> .....	<b>3</b>
<b>2.2. Compostos <math>\beta</math>-lactâmicos</b> .....	<b>5</b>
<b>2.3. Ácidos clavulânico</b> .....	<b>9</b>
<b>2.4. Hidrólise de compostos <math>\beta</math>-lactâmicos</b> .....	<b>14</b>
<b>2.5. Fermentação e processos de separação e purificação</b> .....	<b>16</b>
<b>3. RELEVÂNCIA DO TRABALHO</b> .....	<b>26</b>
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>27</b>
<b>4.1. Equipamentos</b> .....	<b>27</b>
<b>4.2. Reagentes</b> .....	<b>27</b>
<b>4.3. Metodologia</b> .....	<b>28</b>
4.3.1. Determinação da porcentagem de ácido clavulânico na mistura .....	28
4.3.2. Quantificação de ácido clavulânico .....	29
4.3.3. Investigação da estabilidade do ácido clavulânico em solução aquosa .....	30
4.3.4. Preparação das fases estacionárias .....	31
4.3.5. Quantificação de aminoácidos .....	31
4.3.6. Determinação da massa de resina adequada aos estudos de adsorção em batelada .....	32
4.3.7. Investigação da cinética de adsorção do ácido clavulânico em resinas .....	33
4.3.8. Experimentos de dessorção do ácido clavulânico da resina IRA400 .....	34
4.3.9. Influência do pH na adsorção do ácido clavulânico em IRA400 .....	34
4.3.10. Influência da força iônica na adsorção do ácido clavulânico em IRA400 .....	35
4.3.11. Influência da concentração inicial de AC na adsorção em IRA400 .....	37
4.3.12. Cinética de adsorção em IRA400 em condições próximas as reais .....	37
4.3.13. Isotermas de adsorção em IRA400 .....	38
4.3.14. Determinação das entalpias de adsorção .....	38

<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>40</b>
5.1. Determinação da porcentagem de ácido clavulânico na mistura .....	40
5.2. Curvas padrão para quantificação de ácido clavulânico .....	41
5.3. Determinação da estabilidade do ácido clavulânico em função do pH .....	44
5.4. Determinação da massa de resina adequada para adsorção do ácido clavulânico .....	48
5.5. Investigação da cinética de adsorção do ácido clavulânico em resinas .....	50
5.6. Experimentos de dessorção em IRA400 .....	58
5.7. Influência do pH na adsorção do ácido clavulânico em IRA400 .....	61
5.8. Influência da força iônica na adsorção do ácido clavulânico em IRA400 .....	62
5.9. Influência da concentração inicial de ácido clavulânico na adsorção em IRA400 .....	66
5.10. Cinética de adsorção em IRA400 em condições próximas as reais .....	67
5.11. Isotermas de adsorção do ácido clavulânico em IRA400 .....	69
5.12. Determinação da entalpia de adsorção do ácido clavulânico em IRA400 .....	71
<b>6. CONCLUSÕES .....</b>	<b>75</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>77</b>

## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Classificação de antibióticos de acordo com suas estruturas químicas e alguns exemplos.....	4
Tabela 2. Modo de ação de alguns antibióticos.....	5
Tabela 3. Estruturas básicas de compostos $\beta$ -lactâmicos de ocorrência natural e os principais microorganismos produtores desses antibióticos.....	6
Tabela 4. Classificação das $\beta$ -lactamases de acordo com Ambler et al.....	8
Tabela 5. Características principais das três espécies da enzima inibida irreversivelmente pelo clavulanato.....	12
Tabela 6. Características dos principais processos cromatográficos.....	20
Tabela 7. Algumas substâncias biologicamente ativas recuperadas e purificadas por troca-iônica.....	23
Tabela 8. Soluções tampão utilizadas nos experimentos de hidrólise do ácido clavulânico.....	31
Tabela 9. Massas de cloreto de potássio utilizadas para ajustar a força iônica.....	
Tabela 10. Propriedades físicas das resinas utilizadas nos estudos de adsorção do ácido clavulânico.....	31
Tabela 11. Concentração de resina e concentração inicial de ácido clavulânico utilizadas nos diferentes experimentos cinéticos de adsorção.....	33
Tabela 12. Massas de cloreto de sódio adicionadas para se obter valores de força iônica diferentes.....	36
Tabela 13. Dados de massa perdida durante a calcinação a 400°C da mistura 1:1 de clavulanato de potássio e SiO <sub>2</sub> .....	39
Tabela 14. Valores de concentração de ácido clavulânico não degradado (C) em função do tempo nos diversos pHs.....	43
Tabela 15. Valores das constantes cinéticas e tempos de meia vida para a hidrólise do ácido clavulânico em soluções aquosas em diversos pHs, a 20°C e $\mu=0,5$ .....	45
Tabela 16. Valores das constantes parciais de hidrólise do ácido clavulânico em soluções aquosas, a 20°C e $\mu=0,5$ .....	45

Tabela 17. Valores das constantes de velocidade de hidrólise do ácido clavulânico a 20°C para pHs em torno de 2 e 7 em forças iônicas diferentes.....	47
Tabela 18. Valores das constantes de velocidade de hidrólise do ácido clavulânico a 20°C para soluções de mesmo pH e concentração de tampão diferente.....	47
Tabela 19. Valores das concentrações finais (C) e da fração adsorvida ( $C_{ads}/C_0$ ) de ácido clavulânico em função da concentração de IRA400 a 25°C, 200 rpm e $C_0=157,64\text{mg/L}$ .....	48
Tabela 20. Valores dos parâmetros e respectivos desvios padrão do modelo exponencial ajustado aos dados de variação da fração adsorvida em função da concentração de resina a 25°C e 200 rpm e $C_0=157,64\text{mg/L}$ .....	49
Tabela 21. Valores das concentrações finais (C) e da fração adsorvida ( $C_{ads}/C_0$ ) de ácido clavulânico em função da concentração de XAD761 a 25°C, 200 rpm e $C_0=188,98\text{mg/L}$ .....	49
Tabela 22. Valores da concentração livre e da fração de ácido clavulânico adsorvida em função do tempo em 3,75g/L de IRA400, com agitação e sem agitação, a 26°C.....	50
Tabela 23. Valores da concentração livre e da fração de ácido clavulânico adsorvida em função do tempo em 3,75g/L de IRA400 e pH=6,5 a 22, 26 e 30°C.....	51
Tabela 24. Valores dos parâmetros do modelo exponencial ajustado para os dados cinéticos de adsorção do ácido clavulânico a 22, 26 e 30°C e $C_0=70\text{mg/L}$ .....	52
Tabela 25. Valores das constantes de adsorção ( $k_1$ ), dessorção ( $k_2$ ) e de equilíbrio ( $K_{ads}$ ) para a adsorção do ácido clavulânico em 3,75 g/L de IRA400 com $C_0=70\text{mg/L}$ a 22, 26 e 30°C.....	53
Tabela 26. Valores da concentração livre e da fração de ácido clavulânico adsorvida em função do tempo devido à adsorção em 53,6 g/L de IRA400 com $C_0=1\text{g/L}$ e pH=6,5 a 26°C. ....	54
Tabela 27. Valores das constantes de adsorção ( $k_1$ ), dessorção ( $k_2$ ) e de equilíbrio ( $K_{ads}$ ) para a adsorção do ácido clavulânico em 53,6 g/L de IRA400 com $C_0=1\text{g/L}$ a 26°C.....	54
Tabela 28. Valores de concentração de ácido clavulânico livre e da fração adsorvida em função do tempo para 62,5g/L de XAD4 a 26°C.....	55
Tabela 29. Valores da concentração de ácido clavulânico livre e da fração adsorvida em função tempo para o sistema íon-par XAD4-Phe ( $C_{res}=62,5$ ) a 26°C.....	56

Tabela 30. Concentrações de Lys e Arg após 40h em equilíbrio com 50g/L de resina XAD4 a 25°C.....	57
Tabela 31. Valores de concentração de ácido clavulânico livre e fração adsorvida em função do tempo para 62,5 g/L de XAD761 a 26°C.....	57
Tabela 32. Valores de concentração de ácido clavulânico livre e fração adsorvida em função do tempo para 62,5 g/L de XAD4 e XAD761 a 26°C e pH=4,5.....	58
Tabela 33. Valores das concentrações e frações dessorvidas com solução de NaCl 5% a 26°C, a partir de 3,75 g/L da resina IRA400 contendo 60,62 mg/L de ácido clavulânico adsorvido.....	59
Tabela 34. Valores das concentrações e frações dessorvidas com solução de NaCl 10% a 26°C, a partir de 3,75 g/L da resina IRA400 contendo 51,50 mg/L de ácido clavulânico adsorvido.....	59
Tabela 35. Valores dos parâmetros do modelo exponencial ajustado aos dados cinéticos de dessorção do ácido clavulânico a 28°C com solução de NaCl 5% e 10%.....	60
Tabela 36. Valores das constantes de adsorção ( $k_4$ ), dessorção ( $k_3$ ) e de equilíbrio ( $K_{des}$ ) para a dessorção do ácido clavulânico de 3,75 g/L e $C_0=70\text{mg/L}$ de IRA400 empregando-se NaCl 5 e 10%.....	61
Tabela 37. Valores das concentrações iniciais ( $C_0$ ), finais ( $C$ ) e da fração adsorvida ( $C_{ads}/C_0$ ) de AC em IRA400 em diversos valores de pH, a 25°C e 200 rpm.....	61
Tabela 38. Valores das concentrações iniciais ( $C_0$ ), finais ( $C$ ) e da fração adsorvida ( $C_{ads}/C_0$ ) de ácido clavulânico em IRA400 em diversos valores de força iônica, a 25°C e 200 rpm.....	63
Tabela 39. Valores dos parâmetros e respectivos desvios padrão do modelo exponencial ajustado aos dados de variação da fração adsorvida em função da força iônica, a 25°C, 200 rpm e $C_0=70\text{mg/L}$ .....	64
Tabela 40. Concentrações dos íons presentes no meio fermentativo sintético, utilizado em nossos laboratórios para a produção de ácido clavulânico, e cálculo da força iônica total.....	64
Tabela 41. Valores das concentrações finais ( $C$ ) e da fração adsorvida ( $C_{ads}/C_0$ ) de ácido clavulânico em função da concentração de IRA400 em solução de força iônica igual a 0,09 a 25°C, 200 rpm e $C_0= 70,67\text{mg/L}$ .....	65
Tabela 42. Valores das constantes cinéticas de adsorção ( $k_1$ ), de dessorção ( $k_2$ ) e da constante de equilíbrio ( $K_{ads}$ ) para diferentes concentrações iniciais de ácido clavulânico a 26°C e $C_{res}/C_0= 53,57$ .....	



Tabela 43. Valores de concentração de ácido clavulânico livre e fração adsorvida em função do tempo para a adsorção em batelada a 26°C e $C_0=200\text{mg/L}$ , empregando-se uma relação $C_{\text{res}}/C_0=1000$ .....	
Tabela 44. Valores das constantes cinéticas de adsorção ( $k_1$ ), de dessorção ( $k_2$ ) e da constante de equilíbrio ( $K_{\text{ads}}$ ) para 200 mg/L de ácido clavulânico a 26°C e $C_{\text{res}}/C_0 = 1000$ .....	
Tabela 45. Valores de absorvância a 234 nm das soluções sobrenadantes, após 6 horas, para 3,75g/L de IRA400 a 25°C.....	66
Tabela 46. Valores de absorvância a 227 nm e concentrações finais das soluções sobrenadantes, após 6 horas, para 0,02 g/L de IRA400 a 25°C.....	67
Tabela 47. Valores das massas de ácido clavulânico adsorvidas (mg) por unidade (g) de IRA400 a 25°C.....	67
Tabela 48. Valores dos parâmetros dos modelos de Langmuir e Freundlich ajustados para a adsorção do ácido clavulânico em IRA400 a 25°C e 200 rpm.....	68
Tabela 49. Valores dos calores (Q) e das variações de entalpia ( $\Delta H$ ) envolvidos nas interações do ácido clavulânico e da sílica com a água e com diversas resinas.....	69
Tabela 50. Valores das variações de entalpia envolvidas na interação da sílica e do ácido clavulânico com a superfície de diversas resinas a 25°C.....	70
Tabela 51. Valores dos calores (Q) envolvidos na interação de uma mistura de ácido clavulânico e sílica com a resina IRA400 a 25°C.....	71

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Diferença básica entre metabolismo primário e secundário.....	3
Figura 2. Reação de hidrólise de uma penicilina genérica.....	7
Figura 3. Reação de hidrólise de uma cefalosporina genérica.....	7
Figura 4. Estrutura dos grupos R de penicilinas e cefalosporinas mais comuns.....	9
Figura 5. Estrutura química do ácido clavulânico.....	10
Figura 6. Esquema mínimo da interação do ácido clavulânico com a $\beta$ -lactamase TEM-2 .....	11
Figura 7. Colapso do intermediário tetraédrico formado pelo ataque da $\beta$ -lactamase ao anel $\beta$ -lactâmico do ácido clavulânico com formação da acil-enzima.....	11
Figura 8. Formação da acil-enzima a partir do ácido clavulânico e da $\beta$ -lactamase e sua posterior conversão para a forma da enzima inibida reversivelmente.....	12
Figura 9. Esquema biossintético postulado para a síntese do ácido clavulânico, ilustrando o maior fluxo de carbono.....	13
Figura 10. Gráfico de $\log k_{int}$ em função do pH para degradação da benzilpenicilina e cefaloridina em solução aquosa a 35°C e força iônica de 0,5 mol/L.....	15
Figura 11. Pontos passíveis de hidrólise na molécula de uma cefalosporina genérica.....	15
Figura 12. Mecanismo de formação de derivados pirazínicos do clavulanato em solução alcalina.....	17
Figura 13. Representação esquemática geral de um processo fermentativo típico.....	18
Figura 14. Esquema da produção industrial do ácido clavulânico.....	19
Figura 15. Esquema da interação de um ácido orgânico com um sal de amônio quaternário, funcionando como contra-íon.....	22
Figura 16. Esquema da reação do imidazol com o ácido clavulânico.....	30
Figura 17. Reação de um aminoácido genérico e OPA com formação de um produto altamente fluorescente.....	32
Figura 18. Termograma de 3,3298 mg da mistura de clavulanato de potássio e sílica, obtido em atmosfera de ar sintético a 100 mL/min e com velocidade de aquecimento de 20°C/min.....	41

Figura 19. Curva padrão para quantificação de ácido clavulânico através do método espectrofotométrico da reação com imidazol.....	42
Figura 20. Espectro UV de uma solução de ácido clavulânico 15mg/L.....	43
Figura 21. Curva padrão para quantificação de ácido clavulânico por espectrofotometria a 234 nm.....	43
Figura 22. Degradação do ácido clavulânico em função do tempo em pHs 2,42 e 4,22 a 20°C e $\mu=0,5$ .....	44
Figura 23. Degradação do ácido clavulânico em função do tempo em pH 6,20 a 20°C e $\mu=0,5$ .....	45
Figura 24. Degradação do ácido clavulânico em função do tempo em pH 8,69 e 9,95 a 20°C e $\mu=0,5$ .....	45
Figura 25. Constantes globais de hidrólise do ácido clavulânico em função do pH a 20°C e $\mu=0,5$ .....	46
Figura 26. Variação da fração de ácido clavulânico adsorvida em função da concentração de resina IRA400 a 25°C, 200 rpm e $C_0=157,64\text{mg/L}$ .....	49
Figura 27. Variação da fração de ácido clavulânico em função do tempo para 3,75g/L de IRA400 a 25°C: sem agitação e com agitação.....	51
Figura 28. Variação da fração de ácido clavulânico adsorvida em função do tempo devido à adsorção em 3,75g/L de IRA400 e pH=6,5 em três temperaturas: (—)22°C, (—)26°C e (—)30°C.....	52
Figura 29. Variação da fração de ácido clavulânico adsorvida com o tempo em 62,5 g/L de XAD4 a pH 6,5 e 26°C.....	55
Figura 30. Variação da fração de ácido clavulânico adsorvida com o tempo em 62,5 g/L de XAD4-Phe a 26°C.....	56
Figura 31. Variação da fração de ácido clavulânico adsorvida com o tempo em 62,5 g/L de XAD761 a 26°C.....	57
Figura 32. Variação da fração de ácido clavulânico adsorvida em função do tempo para as resinas XAD4 e XAD761 ( $C_{\text{res}}=62,5\text{g/L}$ ) a 26°C e pH=4,5.....	58
Figura 33. Dessorção do ácido clavulânico da resina IRA400 em função do tempo com NaCl: (—)5% e (—)10% a 28°C .....	60

Figura 34. Influência do pH na fração de ácido clavulânico adsorvida por 3,75g/L de IRA400 a 25°C, 200rpm e $C_0=70\text{mg/L}$ .....	62
Figura 35. Influência da força iônica na fração de ácido clavulânico adsorvida por 3,75g/L de IRA400 a 25°C, 200rpm e $C_0=70\text{mg/L}$ .....	63
Figura 36. Variação da fração de ácido clavulânico adsorvida em função da concentração de IRA400 para solução aquosa de força iônica igual a 0,09 a 25°C, 200 rpm e $C_0=70\text{mg/L}$ .....	65
Figura 37. Fração adsorvida em função do tempo para diferentes concentrações iniciais de ácido clavulânico a 26°C e $C_{\text{res}}/C_0=53,57$ : (—) $C_0=78\text{mg/L}$ , (—) $C_0=183\text{mg/L}$ , (—) $C_0=450\text{mg/L}$ , (—) $C_0=830\text{mg/L}$ , (—) $C_0=940\text{mg/L}$ .....	66
Figura 38. Constante cinética de adsorção do ácido clavulânico em IRA400 ( $k_1$ ) em função da concentração inicial ( $C_0$ ) a 26°C e $C_{\text{res}}/C_0=53,57$ .....	67
Figura 39. Gráfico da fração de ácido clavulânico adsorvida em função do tempo para a adsorção em batelada a 26°C e $C_0=200\text{mg/L}$ , empregando-se uma relação $C_{\text{res}}/C_0=1000$ .....	68
Figura 40. Isotermas de adsorção do ácido clavulânico em IRA400 a 25°C e 200 rpm: (—) modelo de Langmuir e (—) modelo de Freundlich.....	70

## 1. INTRODUÇÃO

Uma das maiores restrições à ação biológica dos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos deve-se à ocorrência de  $\beta$ -lactamases que inativam esses compostos através da hidrólise do anel  $\beta$ -lactâmico.

Desde que a eficácia clínica desses compostos é largamente determinada por sua susceptibilidade à hidrólise, o surgimento de um número cada vez maior de bactérias produtoras dessas enzimas levou à busca por antibióticos semi-sintéticos mais potentes. Além do desenvolvimento desses compostos, o uso de inibidores de  $\beta$ -lactamases tem se mostrado uma estratégia terapêutica eficiente na luta contra a resistência bacteriana.

O ácido clavulânico é um eficiente inibidor de  $\beta$ -lactamases que possuem serina em seu sítio ativo (Baggaley et al., 1997), potencializando, assim, a atividade antibacteriana de penicilinas e cefalosporinas.

A produção industrial desse inibidor é normalmente realizada utilizando-se meios de cultura complexos e através de cultivos submersos de *S. clavuligerus*. Durante o processo, outras substâncias (cefamicina C, desacetoxicefalosporina C, penicilina N, etc) também podem ser produzidas, dependendo das condições utilizadas, e a purificação do ácido clavulânico a partir do caldo fermentativo envolve diversos processos. A primeira etapa baseia-se na clarificação do meio por filtração ou centrifugação, seguida por adsorção ou extração líquido-líquido, com um solvente orgânico. Posteriormente, a purificação final é conseguida através de cromatografia de troca-iônica (Videira e Aires-Barros, 1994).

Como a viabilidade econômica dos processos biotecnológicos não depende somente de inovações no processo de produção, provenientes de avanços na biologia molecular, imunologia e microbiologia, deve-se buscar meios para se otimizar os processos de recuperação e purificação do produto (Bautista et al., 1999).

O ácido clavulânico não possui nenhum grupo fortemente hidrofóbico e apresenta velocidades de degradação elevadas em regiões básicas ( $\text{pH} > 7,5$ ) e ácidas ( $\text{pH} < 4,5$ ) (Bersanetti et al., 2000). Isso leva a rendimentos de recuperação baixos, durante os processos de purificação, quando comparado a outros compostos  $\beta$ -lactâmicos (Mayer et al., 1997).

Desta forma, para se otimizar os processos de purificação do ácido clavulânico deve-se ter um conhecimento da sua cinética de decomposição, que é de grande interesse também durante o próprio processo fermentativo. Além disso, a busca de métodos eficientes para o isolamento deste composto também devem ser investigados.

O ácido clavulânico sofre ionização em soluções aquosas e assim pode-se empregar resinas de troca iônica, carregadas positivamente, para sua recuperação a partir do caldo fermentativo.

Outra possibilidade para o isolamento e purificação deste composto  $\beta$ -lactâmico é a cromatografia de fase reversa com supressão iônica, conseguida pelo ajuste do pH da fase móvel, ou com a utilização de contra-íons (Riley, 1997). Mayer et al. (1996 e 1997) estudaram a purificação de ácido clavulânico, empregando sais de amônio quaternário como íon par. Assim, a utilização de outros tipos de contra-íons, como por exemplo, os aminoácidos também pode ser investigada.

Levando-se em consideração a existência de inúmeras técnicas para a separação de compostos orgânicos, estudos cinéticos e termodinâmicos do processo de adsorção do ácido clavulânico são de grande importância para o estabelecimento e otimização de condições e etapas para sua separação e ou purificação.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Antibióticos e metabolismo secundário

A época logo após a Segunda Guerra Mundial foi um período ativo no desenvolvimento de processos fermentativos para produção de antibióticos, que são definidos como metabólitos secundários (Chaubal et al., 1995).

Um metabólito secundário é um produto que parece não ter uma função óbvia no metabolismo celular. Estes compostos não são produzidos durante a fase log de crescimento do microrganismo (trofofase), como acontece com os metabólitos primários que são essenciais para o metabolismo celular e incluem: aminoácidos, nucleotídeos, proteínas, lipídeos, ácidos nucleicos, carboidratos, etc. Ao contrário disto, os metabólitos secundários são produzidos durante a fase estacionária (idiofase) e são elaborados, a partir dos intermediários e produtos do metabolismo primário (Stanbury e Whitaker, 1984). A Figura 1 (Madigan et al., 1997) ilustra processos típicos de produção de metabólitos primários e secundários.

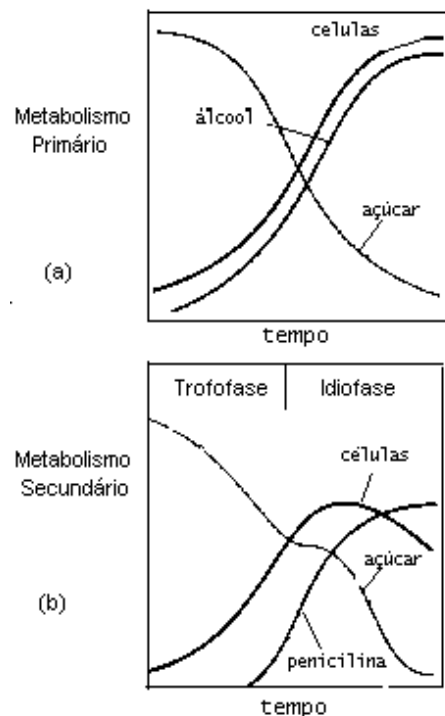


Figura 1. Diferença básica entre metabolismo primário e secundário. (a) Metabolismo primário: formação de álcool a partir de açúcar por leveduras. (b) Metabolismo secundário: formação de penicilina a partir de açúcar, mostrando a separação entre a fase de crescimento (trofofase) e a fase de produção (idiofase).

Dos metabólitos secundários produzidos industrialmente, provavelmente os mais importantes são os antibióticos. Esses compostos são agentes antimicrobianos, elaborados por seres vivos e capazes de agir em pequenas concentrações (Lacaz, 1975).

Industrialmente os antibióticos são produzidos principalmente por fungos filamentosos e por bactérias do grupo dos actinomicetos e, como existe um grande número destes metabólitos secundários quimicamente relacionados, estes são agrupados em famílias, como aparece ilustrado na Tabela 1 (Madigan et al., 1997).

Tabela 1. Classificação de antibióticos de acordo com suas estruturas químicas e alguns exemplos.

<b>Família</b>	<b>Exemplos</b>
Antibióticos contendo carboidratos	Streptomicina, Vancomicina
Lactonas macrocíclicas	Eritromicina, Rifamicina, Tetranactina
Quinonas e antibióticos relacionados	Tetraciclina, Adreamicina, Mitomicina
Antibióticos peptídicos	Penicilina, Bacitracina, Actinomicinas
Antibióticos heterocíclicos contendo nitrogênio	Polioxinas
Antibióticos heterocíclicos contendo oxigênio	Monensina
Antibióticos aromáticos	Cloranfenicol, Griseofulvina
Antibióticos alifáticos	Fosfomicinas
Antibióticos quinolínicos	Norfloxacina, Ciprofloxacina

Os antibióticos podem atuar sobre os microrganismos de diversas maneiras (Tabela 2). Os principais pontos de ação incluem:

- 1) Inibição da síntese da parede celular;
- 2) Lesão da membrana citoplasmática;
- 3) Interferência na síntese de proteínas;
- 4) Interferência na síntese de ácidos nucléicos.

Assim, a toxicidade desses agentes está relacionada com as diferenças entre a estrutura e a composição química das células procarióticas e eucarióticas (Pelczar et al., 1996).

Dentre os metabólitos secundários, os compostos  $\beta$ -lactâmicos representam, ainda hoje, um dos grupos de fármacos mais importantes, sob o ponto de vista terapêutico e



comercial. Aproximadamente 60% do mercado mundial dos antibióticos é relativo a comercialização dos compostos  $\beta$ -lactâmicos, principalmente penicilinas e cefalosporinas semi-sintéticas, derivadas dos compostos naturais penicilina G e cefalosporina C (Mayer et al., 1996).

Tabela 2. Modo de ação de alguns antibióticos.

<b>Mecanismo de Ação</b>	<b>Antibióticos</b>
Síntese da parede celular	$\beta$ -lactâmicos, Bacitracina
Estrutura da membrana citoplasmática	Polimixinas
Metabolismo do ácido fólico	Sulfonamidas
Síntese de proteínas (inibidores 50S)	Eritromicina, Cloranfenicol, Lincomicina
Síntese de proteínas (inibidores 30S)	Tetraciclina, Estreptomicina, Amicacina
Síntese de proteínas (t-RNA)	Puromicina
DNA girase	Novobiocina

## 2.2. Compostos $\beta$ -lactâmicos

Os antibióticos  $\beta$ -lactâmicos que incluem as penicilinas, cefalosporinas, monobactâmicos, carbapenens e clavams são assim denominados pois possuem um anel  $\beta$ -lactâmico, como parte de um sistema de anéis heterocíclicos (Pelczar et al., 1996).

Essa família de antibióticos é dividida em cinco grupos principais (Tabela 3), de acordo com suas características estruturais (Madigan et al., 1997). Todos estes compostos, com exceção dos monobactâmicos, são formados por um sistema bicíclico de anéis.

Tais substâncias compreendem uma das maiores classes de agentes antibacterianos e exercem seus efeitos letais através da interferência na maquinaria metabólica, responsável pelo crescimento e desenvolvimento da parede celular bacteriana (Charnas e Knowles, 1981). O alvo desses compostos  $\beta$ -lactâmicos é a reação de transpeptização, envolvida na etapa de formação das ligações cruzadas durante a biossíntese do peptidoglicano. Como essa reação só acontece em bactérias, esses antibióticos possuem alta especificidade e baixa toxicidade (Madigan et al., 1997).

Tabela 3. Estruturas básicas de compostos  $\beta$ -lactâmicos de ocorrência natural e os principais microorganismos produtores desses antibióticos. As posições moleculares onde ocorrem substituições químicas são indicadas por R.

Estruturas químicas básicas	Antibióticos	Principais espécies produtoras
<p><b>Penam</b></p>	Penicilinas	<i>Penicillium chrysogenum</i> <i>Aspergillus nidulans</i> <i>Cephalosporium acremonium</i> <i>Streptomyces clavuligerus</i>
<p><b>Ceph-3-em</b></p>	Cefalosporinas	<i>Cephalosporium acremonium</i> <i>Nocardia lactamdurans</i> <i>Streptomyces clavuligerus</i>
<p><b>Clavam</b></p>	Ácido clavulânico	<i>Streptomyces clavuligerus</i>
<p><b>Carbapenem</b></p>	Tienamicinas Ácidos olivânicos	<i>Streptomyces cattleya</i> <i>Streptomyces olivaceus</i>
<p><b>Monolactam</b></p>	Monobactâmicos	<i>Gluconobacter</i> sp. <i>Chromobacterium violaceum</i> <i>Pseudomonas acidophila</i> <i>Pseudomonas mesoacidophila</i> <i>Acetobacter</i> sp. <i>Flexibacter</i> sp.
	Nocardicinas	<i>Nocardia uniformis</i>

Assim, a atividade biológica dessas substâncias é devida a sua ligação a um resíduo de serina do sítio ativo de um grupo de enzimas (PBP), que servem para completar a síntese

da parede celular bacteriana, através da formação de ligações cruzadas, entre as cadeias de peptidoglicano. Como as células de mamíferos não possuem esse componente de parede celular, os antibióticos  $\beta$ -lactâmicos geralmente têm uma razão entre efeito terapêutico e efeito tóxico muito favorável (Pitarch et al., 1998).

A resistência bacteriana ao efeito letal desses compostos tornou-se um problema clínico óbvio e pode ter diferentes origens. A causa prevalente deriva da produção pela bactéria de uma enzima denominada  $\beta$ -lactamase, como mecanismo de defesa contra os antibióticos  $\beta$ -lactâmicos (Cartwright e Coulson, 1979). No final de 1940 e início de 1950, o uso indiscriminado da penicilina G acarretou um decréscimo dramático na susceptibilidade de *Staphylococcus* a este antibiótico, devido à produção dessa enzima (Baggaley et al., 1997).

As  $\beta$ -lactamases (EC 3.5.2.6) são enzimas de origem bacteriana, produzidas principalmente por linhagens de *Escherichia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Enterobacter* e *Staphylococcus* (Cole et al., 1985), que atuam hidrolisando a ligação C-N do anel  $\beta$ -lactâmico de penicilinas (Figura 2) e cefalosporinas (Figura 3) (Ross e O'Callaghan, 1975). Assim, antes que estes antibióticos possam atuar na carboxipeptidase ou transpeptidase das bactérias (Frau et al., 1994), são gerados respectivamente os ácidos penicilóico e cefalospórico que não possuem atividade (Charnas e Knowles, 1981).

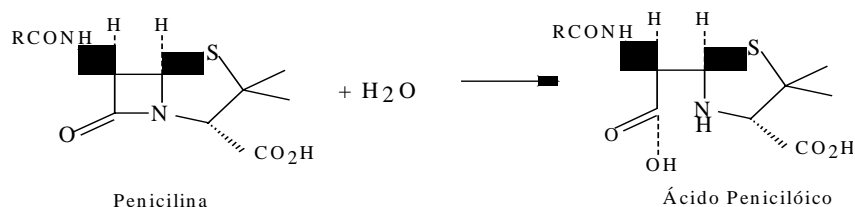


Figura 2. Reação de hidrólise de uma penicilina genérica.

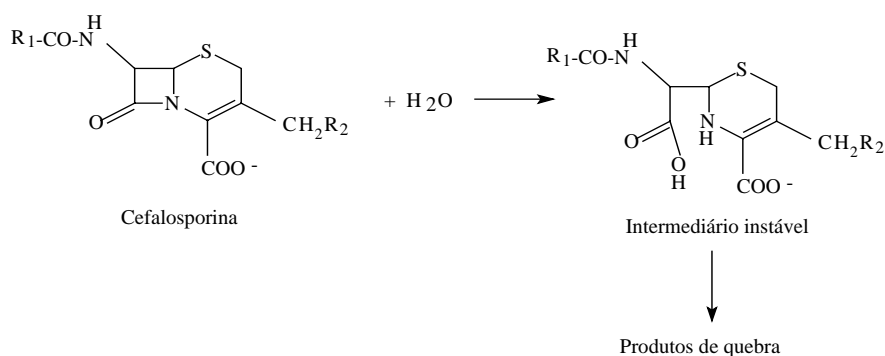


Figura 3. Reação de hidrólise de uma cefalosporina genérica.

Devido ao grande número de  $\beta$ -lactamases existentes, elas foram classificadas por diversos pesquisadores, de acordo com a similaridade de seqüência, seletividade pelos diferentes substratos e outros parâmetros bioquímicos. A classificação de Ambler separa as metaloenzimas (Classe B), daquelas que possuem um resíduo de serina nucleofílico no sítio ativo, as quais foram divididas em três classes (Tabela 4). As enzimas da Classe A são normalmente seletivas para penicilinas, enquanto as  $\beta$ -lactamases da Classe C hidrolisam as cefalosporinas mais rapidamente do que as penicilinas (Baggaley et al., 1997).

Tabela 4. Classificação das  $\beta$ -lactamases de acordo com Ambler et al.

<b>Classe</b>	<b>Espécie</b>	<b>Sítio Ativo</b>	<b>Microrganismos produtores</b>
A	penicilinas	Resíduo de Ser	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Escherichia coli</i>
B	metaloenzimas	Metal (Zn)	<i>Bacillus cereus</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
C	cefalosporinas	Resíduo de Ser	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Escherichia coli</i>
D	oxacilinas	Resíduo de Ser	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Escherichia coli</i>

A eficiência clínica dos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos é largamente determinada por sua susceptibilidade à hidrólise, catalisada por essas enzimas. Desta forma, a proliferação de bactérias produtoras de  $\beta$ -lactamases levou à busca de antibióticos que tivessem tanto resistência à hidrólise quanto eficiência (Fisher et al., 1978).

Este problema foi originalmente enfrentado pelo desenvolvimento de antibióticos  $\beta$ -lactâmicos que fossem menos susceptíveis à ação das  $\beta$ -lactamases. Isso foi conseguido pela alteração da natureza da cadeia lateral da penicilina G e cefalosporina C (Baggaley et al., 1997), através do uso de métodos químicos associados à fermentação tradicional, levando à produção dos antibióticos semi-sintéticos. O material de partida, no caso das penicilinas, é a penicilina G (produzida por fermentação). Este composto é, então, quebrado quimicamente ou enzimaticamente e o núcleo 6-APA resultante pode ser acoplado a diversas cadeias laterais, o que leva à formação das penicilinas semi-sintéticas. De forma semelhante, um grande número de cefalosporinas foram produzidas, a partir da cefalosporina C (Figura 4) (Baggaley et al., 1994).

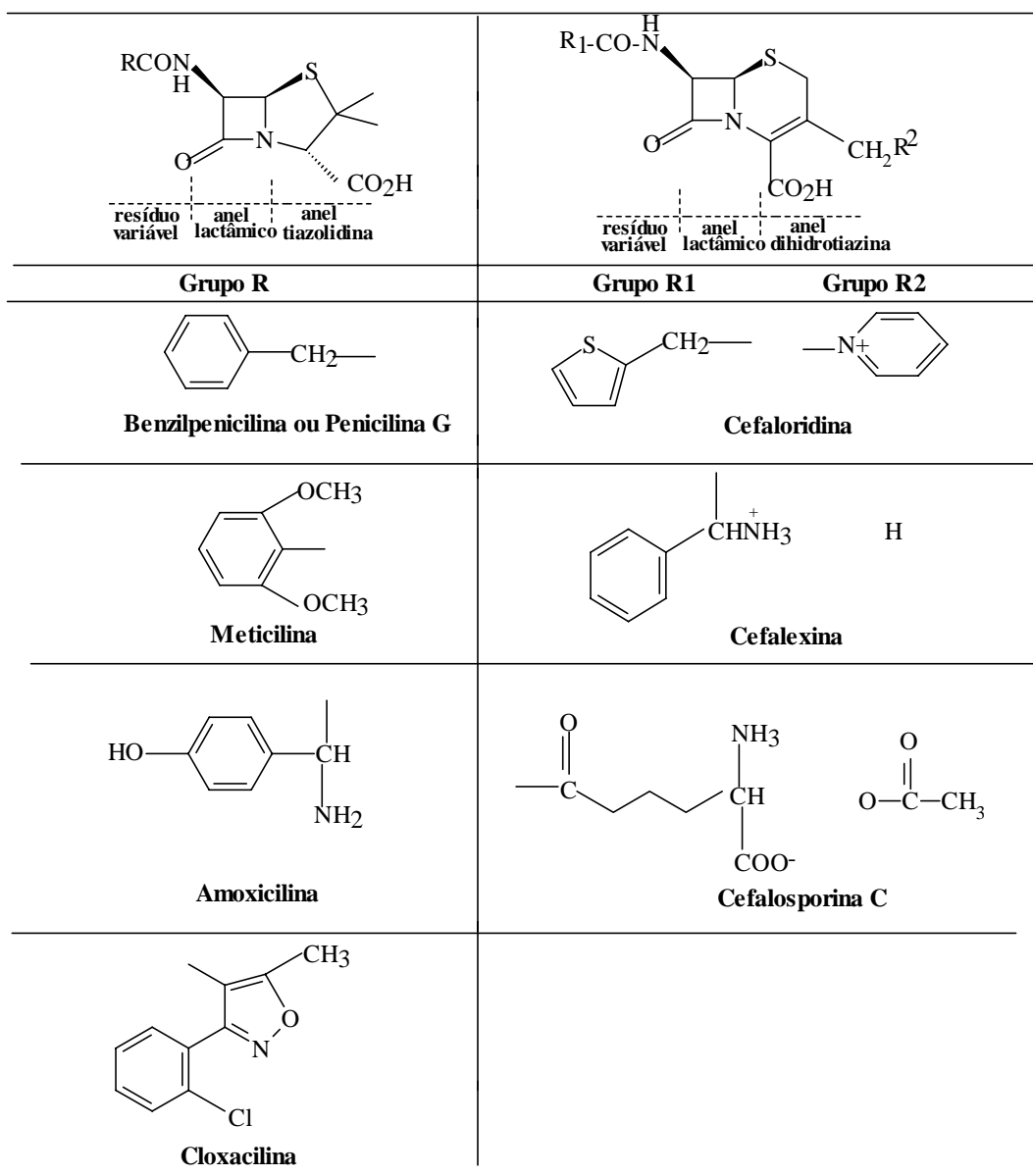


Figura 4. Estrutura dos grupos R de penicilinas e cefalosporinas mais comuns.

Além do desenvolvimento desses antibióticos semi-sintéticos, o uso de inibidores de  $\beta$ -lactamases tem se mostrado uma estratégia terapêutica eficiente na luta contra a resistência bacteriana (Fisher et al., 1978).

### 2.3. Ácido clavulânico

Investigando-se culturas de *Streptomyces clavuligerus* observou-se, dentre os diversos metabólitos produzidos por este microrganismo, um composto com atividade

inibitória de  $\beta$ -lactamases pronunciada, o qual foi denominado ácido clavulânico (Reading e Cole, 1977).

O ácido clavulânico ( $C_8H_9NO_5$ ) é um composto  $\beta$ -lactâmico estruturalmente diferente das penicilinas e cefalosporinas, já que possui um átomo de oxigênio no lugar do átomo de enxofre e um grupo hidroxietilideno no carbono 2, não possuindo o grupo aminoacil no carbono 6, típico daqueles antibióticos (Reading e Cole, 1977). Assim, sua estrutura química consiste de um anel  $\beta$ -lactâmico fundido a um anel oxazolidina (Figura 5).

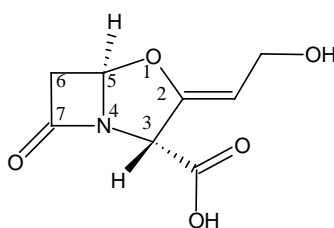


Figura 5. Estrutura química do ácido clavulânico.

Essa substância apresenta uma atividade antibacteriana fraca, mas é um potente inibidor de uma ampla faixa de  $\beta$ -lactamases que possuem serina em seu sítio ativo (Baggaley et al., 1997). Assim, seu uso combinado com certas penicilinas, como por exemplo, a amoxicilina, resulta em sinergismo competitivo que expande o espectro de atividade da penicilina (Abdel-Moety et al., 1989). Essa combinação vem sendo utilizada com sucesso no tratamento de infecções bacterianas nas quais o microrganismo patogênico é resistente aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos (Eckers et al., 1996).

Diversas evidências cinéticas demonstraram que existem três vias possíveis de interação do ácido clavulânico, ligado a um sítio ativo de uma  $\beta$ -lactamase de *Escherichia coli* (Charnas et al., 1978; Fisher et al., 1978; Charnas e Knowles, 1981; Reading e Farmer, 1981):

- o inibidor é destruído cataliticamente pela enzima, assim como ocorre com outros compostos  $\beta$ -lactâmicos;
- a enzima é inibida reversivelmente;
- a enzima é inibida irreversivelmente.

A complexidade química e cinética da interação desse inibidor com a  $\beta$ -lactamase TEM-2 requer a formulação de diversas rotas para a formação da enzima inativa. Um

esquema mínimo, consistente com os resultados cinéticos e com a existência de três espécies distintas da forma da enzima inativa, é apresentado na Figura 6.

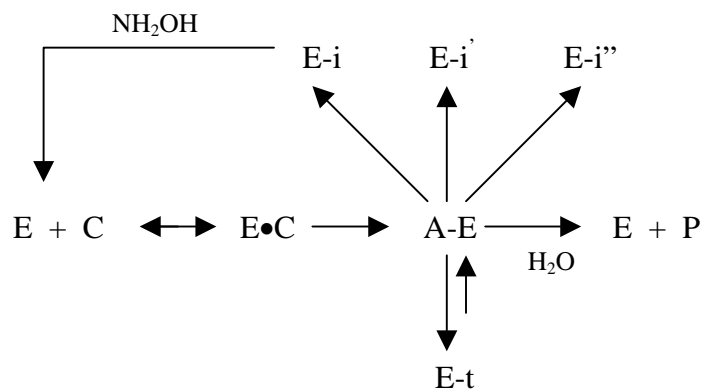


Figura 6. Esquema mínimo da interação do ácido clavulânico com a β-lactamase TEM-2 (E = enzima livre, C = ac.clavulânico, E•C = complexo de Michaelis, A-E = intermediário acil-enzima, E-t = enzima inibida transitoriamente, P = produtos da quebra hidrolítica do ácido clavulânico, E-i = forma inativada da enzima que pode ser reativada por hidroxilamina, E-i' e E-i'' = formas inativadas da enzima que são inertes a hidroxilamina).

Consistente com a demonstração de que a reação catalisada pela β-lactamase procede via acil-enzima, torna-se claro que o ácido clavulânico primeiramente atua acilando a enzima (Figura 7). Foi também verificado, através de estudo semelhante com o ácido 9-desoxiclavulânico, que o grupamento álcool da molécula de ácido clavulânico é irrelevante para sua interação com a enzima (Charnas e Knowles, 1981).

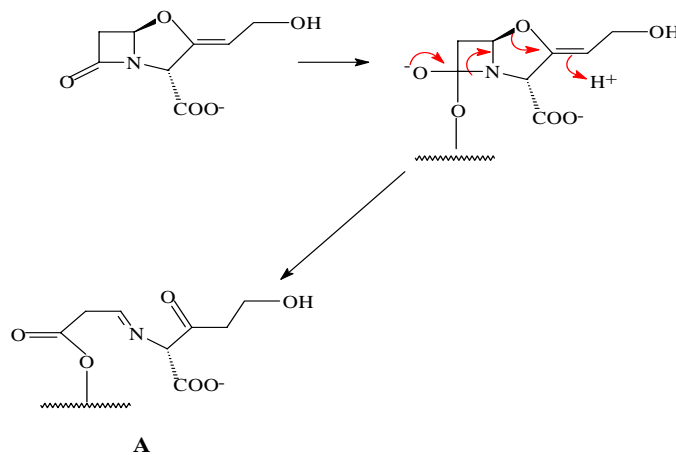


Figura 7. Colapso do intermediário tetraédrico formado pelo ataque da β-lactamase ao anel β-lactâmico do ácido clavulânico com formação da acil-enzima (A).

Como mostrado na Figura 7, a primeira forma da enzima acilada é a imina A, que é convertida de forma reversível na enzima inativada transitoriamente (E-t). A característica mais notável da enzima inibida reversivelmente é a sua intensa absorção de luz em comprimentos de onda próximos a 280 nm, o que pode ser atribuído ao grupo  $\beta$ -aminoacrilato (-C=C-N-) (Charnas et al., 1978). Assim, a formação de E-t, a partir da acil-enzima (A-E), envolve a tautomerização da imina A, formando uma enamina cromofórica mais estável (Figura 8).

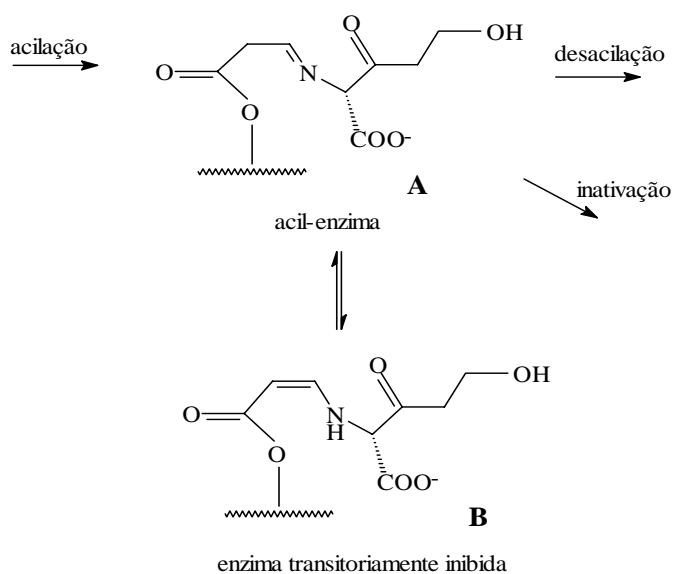


Figura 8. Formação da acil-enzima a partir do ácido clavulânico e da  $\beta$ -lactamase e sua posterior conversão para a forma da enzima inibida reversivelmente.

Quanto a enzima inibida irreversivelmente, foram constatadas três espécies (E-i, E-i' e E-i''). As principais diferenças entre essas formas são apresentadas na Tabela 5 (Charnas e Knowles, 1981).

Tabela 5. Características principais das três espécies da enzima inibida irreversivelmente pelo clavulanato.

Espécie	Características
E-i	Possui grupo cromóforo a 280 nm Possui todo o esqueleto da molécula de clavulanato unida a enzima Reage com hidroxilamina regenerando a enzima ativa
E-i'	Não possui grupo cromóforo a 280 nm Possui menos da metade do esqueleto da molécula de clavulanato
E-i''	Possui o menor valor de pI Possui todo o esqueleto da molécula de clavulanato unida a enzima



Essa atividade inibidora de  $\beta$ -lactamases torna o ácido clavulânico um composto de grande interesse, principalmente para indústrias farmacêuticas e estudos têm sido realizados para a elucidação da rota biossintética desse composto. Experimentos com nutrientes radioláveis mostraram que a arginina e a ornitina são eficientemente incorporados durante a síntese do ácido clavulânico (Figura 9) (Ives e Bushell, 1997).

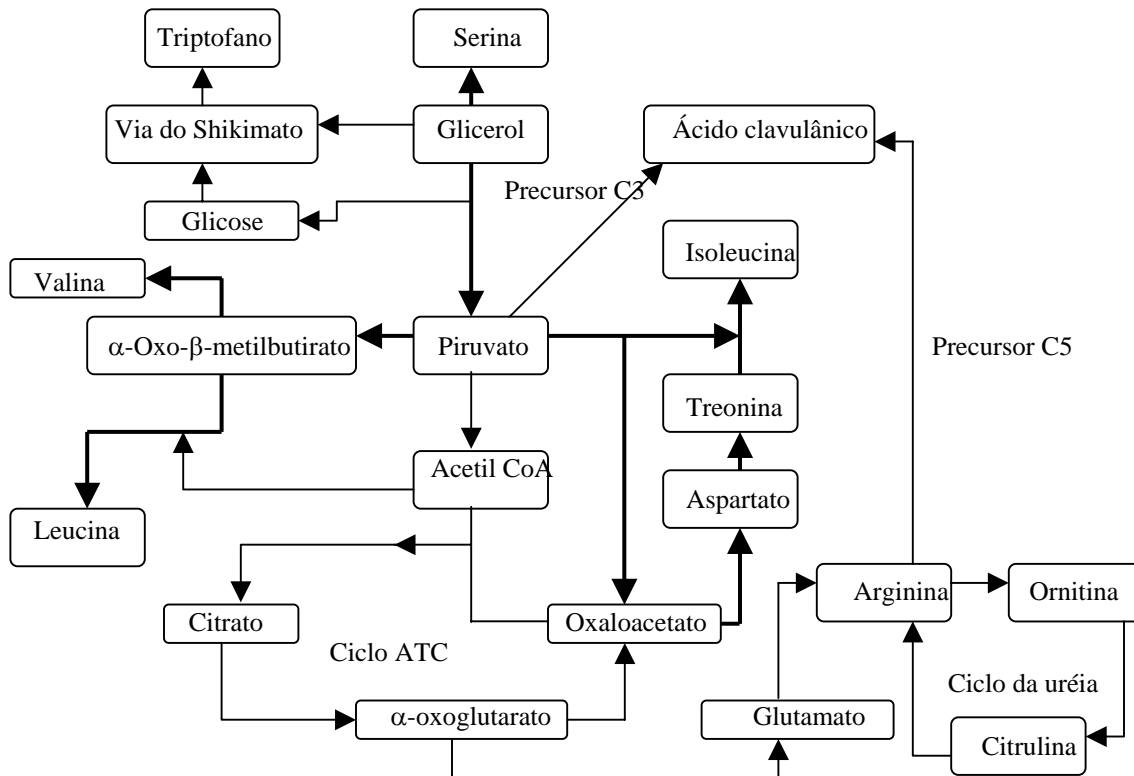


Figura 9. Esquema biossintético postulado para a síntese do ácido clavulânico, ilustrando o maior fluxo de carbono (muitas etapas intermediárias foram omitidas). As setas largas indicam os fluxos que competem com a produção do ácido clavulânico as quais são influenciadas por aminoácidos.

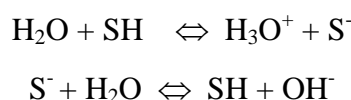
O entendimento da biossíntese desse inibidor é útil para a otimização da sua produção, bem como o entendimento das suas propriedades químicas, o que pode auxiliar o estudo dos processos de recuperação deste composto, a partir do caldo fermentativo.

A baixa estabilidade em soluções aquosas e a ausência de grupos fortemente hidrofóbicos são as duas principais propriedades químicas do ácido clavulânico que devem ser exploradas na busca de melhorias nos rendimentos do processo de produção.

## 2.4. Hidrólise dos compostos $\beta$ -lactâmicos

A velocidade de degradação dos compostos  $\beta$ -lactâmicos é de grande interesse na síntese de derivados destes compostos e principalmente no processamento do caldo fermentativo. Desta forma, têm sido realizados estudos sobre a estabilidade de vários compostos  $\beta$ -lactâmicos em soluções aquosas, como a cefalosporina C (Konecny et al., 1973), aztreonama e nocardicina A (Méndez et al., 1992), cefaloridina (Vilanova et al., 1993), cefotaxima (Vilanova et al., 1994), cefaclor (Vilanova et al., 1996) e cefdinir (Okamoto et al., 1996).

A hidrólise de qualquer composto nada mais é do que uma reação homogênea em solução, na qual a água participa como um dos reagentes. As reações hidrolíticas podem ser catalisadas por ácidos ou por bases e nessas catálises a molécula de água, devido a sua natureza anfotérica, pode funcionar tanto como ácido, doando prótons, quanto como base, recebendo prótons, como é mostrado no esquema abaixo (Laidler, 1950; Morrison e Boyd, 1994):



A decomposição dos compostos  $\beta$ -lactâmicos, devida ao ataque de moléculas de água ou de íons hidroxila ao grupo carbonila do anel, segue uma cinética de pseudo primeira ordem, obedecendo a seguinte equação (Latham, 1974; Levenspiel, 1974; Moore, 1976):

$$\frac{-dC}{dt} = kC \quad (\text{Eq. 1})$$

É interessante ressaltar que a velocidade de quebra do anel  $\beta$ -lactâmico está estritamente relacionada com a estrutura química do respectivo composto (Llinás et al., 1998), com a concentração de íons  $\text{H}^+$  e  $\text{OH}^-$  presentes em solução (Laidler, 1950) e com a temperatura.

De acordo com Llinás et al. (1998), apesar da semelhança estrutural entre as penicilinas e as cefalosporinas, suas curvas das constantes de velocidade ( $k$ ) em função do pH mostram diferenças claras. Enquanto para as penicilinas essas curvas têm a forma de

um V, para as cefalosporinas mostram um comportamento em U, uma vez que, esses últimos compostos mostram uma reação espontânea ou independente do pH (Figura 10).

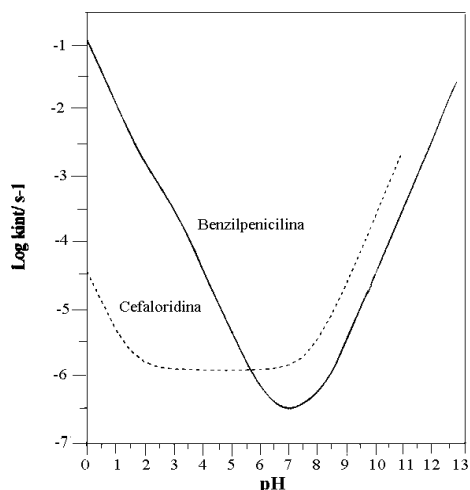


Figura 10. Gráfico de  $\log k_{\text{int}}$  em função do pH para a degradação da benzilpenicilina e cefaloridina em solução aquosa a 35°C e força iônica de 0,5 mol.L<sup>-1</sup>, onde  $k_{\text{int}}$  corresponde a constante de velocidade de pseudo primeira ordem (s<sup>-1</sup>).

A molécula de ácido clavulânico apresenta um único sítio susceptível ao ataque por íons hidróxido OH<sup>-</sup> e pela molécula de água: o grupo carbonila do anel  $\beta$ -lactâmico. Diferentemente, a cefalosporina C possui três sítios capazes de sofrer hidrólise: o grupo éster da cadeia lateral, um grupo amida da cadeia aminoadípica e o anel  $\beta$ -lactâmico (1, 2 e 3 na Figura 11) (Konecny et al., 1975), enquanto a cefotaxima sofre ataque hidrolítico em dois pontos de sua molécula (1 e 2 na Figura 11) (Vilanova et al., 1994).

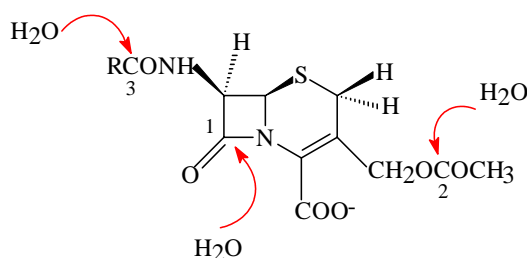


Figura 11. Pontos passíveis de hidrólise na molécula de uma cefalosporina genérica.

É bem conhecido que as penicilinas são degradadas em solução alcalina, produzindo o ácido penicilóico correspondente e que este último sofre epimerização no carbono 5,

quando em solução aquosa. No entanto, estudos envolvendo as estruturas dos produtos e o mecanismo de degradação do ácido clavulânico são raros. Um provável mecanismo de decomposição em solução alcalina (Figura 12) foi proposto por Haginaka et al. (1985) e a primeira etapa inicia-se com o ataque do íon hidroxila ao anel  $\beta$ -lactâmico da molécula de clavulanato (I). Como o produto formado pela clivagem do anel é instável, quando comparado aos ácidos penicilínicos, imediatamente ocorre a fissão da ligação C-O do anel oxapenam. O produto resultante (II) é então descarboxilado para produzir o ácido 8-hidroxi-6-oxo-4-aza-2-octenóico (IV) ou sofre eliminação de uma molécula de ácido formilacético, formando o ácido 2-amino-5-hidroxi-3-oxopentanóico (III). Esta etapa de reação é seguida por uma eliminação hidrolítica do ácido formilacético de IV e/ou por uma descarboxilação de III, ambas produzindo o 4-amino-3-oxobutanol (V) como um intermediário chave. A dimerização de V leva a um derivado dihidropirazínico (VI) e uma oxidação espontânea deste composto, na presença de ar, pode produzir o composto VII. O ataque de moléculas de formaldeído, ácido formilacético e acetaldeído levam respectivamente aos derivados pirazínicos VIII, IX e X. É importante ressaltar que esses produtos da degradação do clavulanato não possuem atividade biológica.

## 2.5. Fermentação e processos de separação e purificação

Qualquer processo fermentativo pode ser caracterizado genericamente por seis etapas básicas:

- 1) Formulação do meio de cultura para ser usado durante o desenvolvimento do inóculo;
- 2) A esterilização de meios, fermentadores e equipamentos auxiliares;
- 3) Obtenção de uma cultura pura e ativa em quantidade suficiente para inocular o fermentador;
- 4) O crescimento do microrganismo no fermentador sob condições ótimas para a formação do produto;
- 5) A extração do produto e sua purificação;
- 6) O descarte dos efluentes produzidos pelo processo.

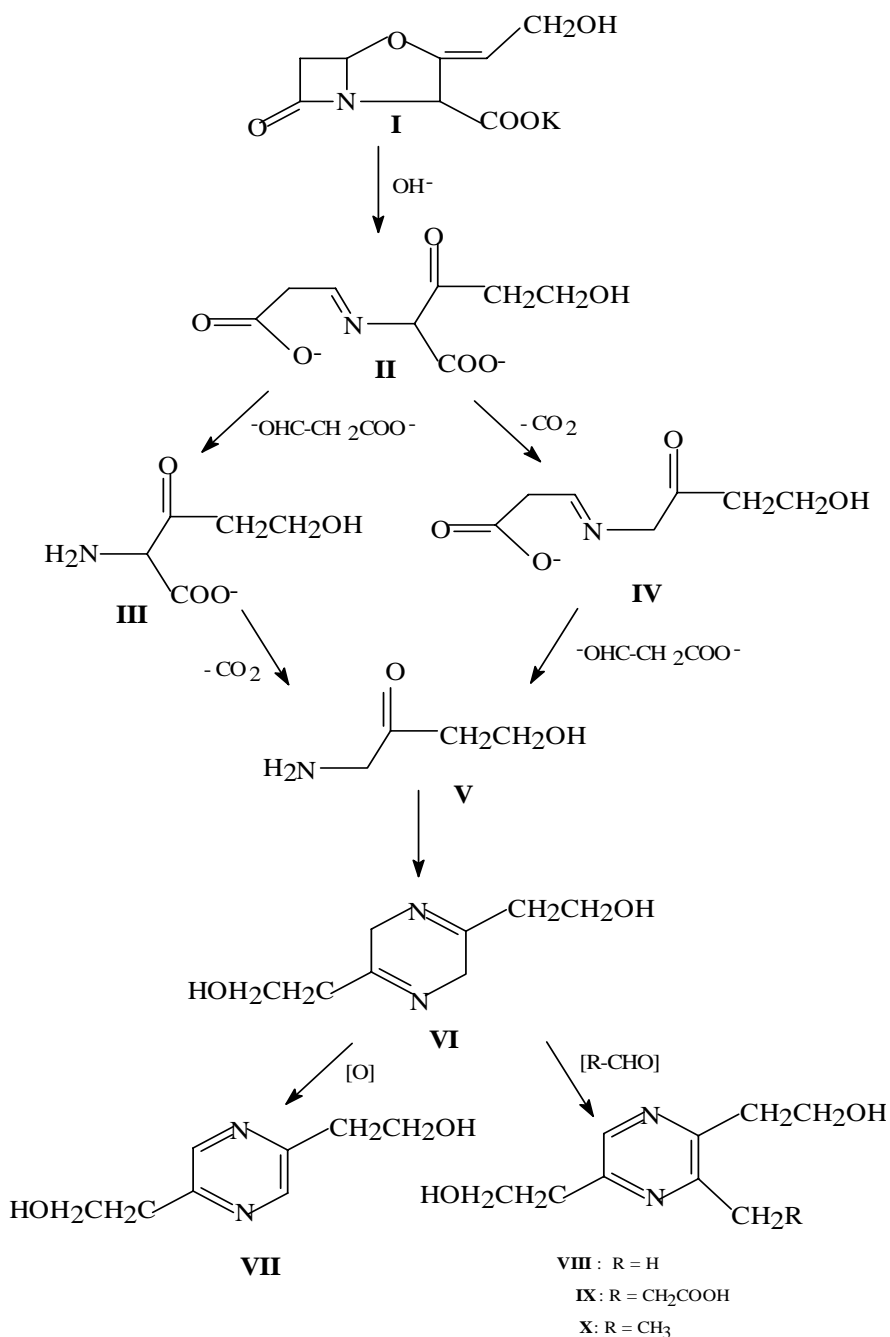


Figura 12. Mecanismo de formação de derivados pirazínicos do clavulanato em solução alcalina.

As inter-relações entre essas seis etapas básicas são apresentadas na Figura 13. Antes que um processo fermentativo seja estabelecido, um microrganismo produtor deve ser isolado, modificado para que produza o metabólito desejado em quantidades satisfatórias e seus requerimentos nutricionais devem ser determinados. O desenvolvimento

do processo deve envolver uma melhoria contínua do organismo envolvido no processo, do meio de cultura e dos processos de extração e purificação (Stanbury e Whitaker, 1984).

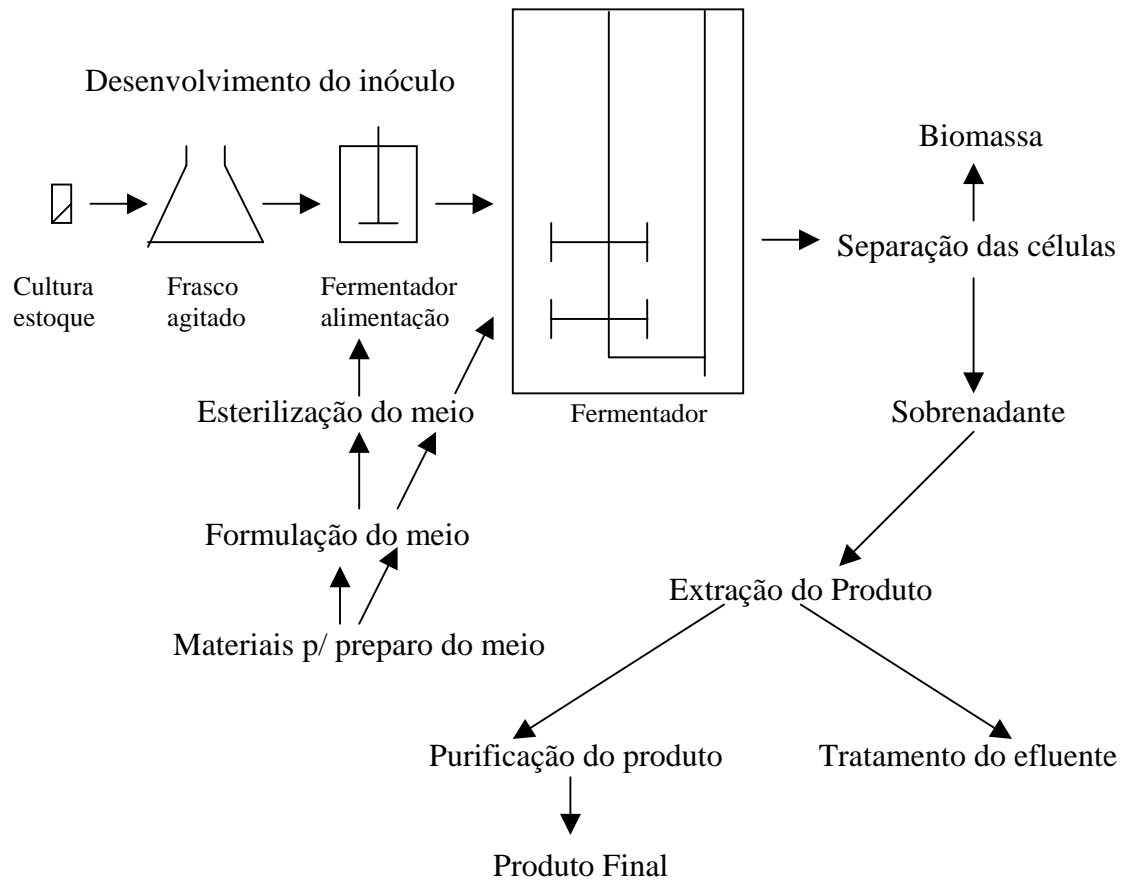


Figura 13. Representação esquemática geral de um processo fermentativo típico.

À medida que um processo fermentativo se desenvolve, o produto vai sendo formado e acumulado. Este acúmulo raramente se dá na fase lag, começando normalmente na fase logarítmica (metabólitos primários), ou então podendo coincidir com a fase estacionária ou de declínio (metabólitos secundários). Em qualquer caso, há uma curva teórica, correspondente ao aumento da produção do metabólito, até um máximo e posterior declínio. As indústrias não podem se ater exclusivamente ao rendimento máximo, uma vez que, o máximo de produção econômica nem sempre coincide com o máximo de produção técnica. Atingir este máximo, ou ultrapassá-lo, pode acarretar dificuldades na recuperação do produto desejado, além de causar uma alta do custo industrial com o aumento do tempo

de fermentação. Este aumento de custos deve-se aos maiores gastos de energia, aeração, nutrientes, anti-espumantes, mão-de-obra e outros, podendo ser mais elevados que a receita do produto, quando recuperado em um estágio menos avançado.

Atingindo-se o máximo rendimento comercial, com a observação dos cuidados específicos para cada processo fermentativo, inicia-se a fase de separação do produto, a fim de apresentá-lo da forma mais pura possível para o tipo particular de consumo ao qual se destina (Lima, 1975).

A maioria desses bioprodutos são substâncias sensíveis e, portanto, suas estruturas e atividades biológicas podem ser preservadas somente sob condições específicas do meio. Assim, os métodos para a recuperação e/ou purificação destes compostos devem ser adaptados às suas estruturas lábeis e aos limites de estabilidade, em relação à temperatura, força iônica e pH (Schmidt-Kastner e Golker, 1987).

A produção industrial do ácido clavulânico é normalmente realizada utilizando-se meios de cultura complexos e através de cultivos submersos de *Streptomyces clavuligerus*, em biorreator tipo tanque agitado e aerado, sendo a proteína de soja um importante nutriente para a biossíntese desse composto (Butterworth, 1984). De acordo com Videira e Aires-Barros (1994), a separação e a purificação são conseguidas através de filtração ou centrifugação, para separação das células e produtos insolúveis, seguida de etapas de adsorção ou extração líquido-líquido com um solvente orgânico, a fim de se eliminar os principais contaminantes presentes em solução. Posteriormente, a purificação fina é conseguida através de cromatografia de troca-iônica (Figura 14).

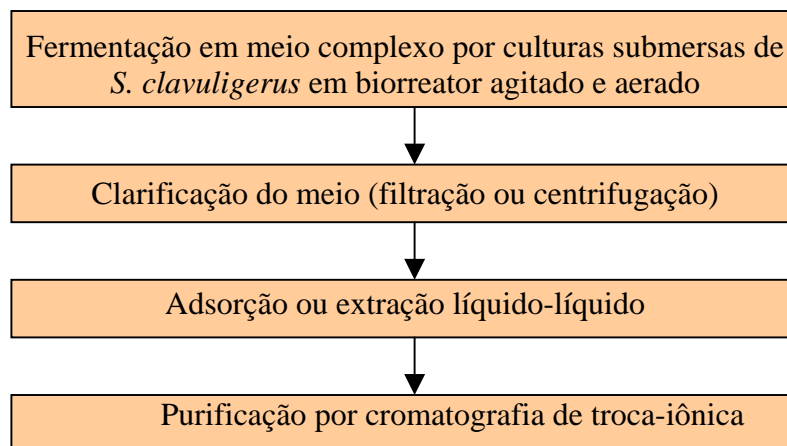


Figura 14. Esquema da produção industrial do ácido clavulânico.

A purificação de substâncias por cromatografia é baseada na alta seletividade deste procedimento. A separação dos componentes, presentes na mistura ou extrato bruto, é conseguida através das diferenças nas intensidades ou energias das interações dos diversos componentes com a fase estacionária. Assim, existem vários tipos de cromatografia, de acordo com a natureza das forças de ligação e com o princípio de separação (Tabela 6) (Schmidt-Kastner e Golker, 1987).

Tabela 6. Características dos principais processos cromatográficos.

<b>Técnica</b>	<b>Princípio de ação</b>	<b>Separação de acordo com</b>
Cromatografia de adsorção	Interações superficiais	Afinidade com a superfície
Cromatografia de troca-iônica	Interações iônicas	Carga
Cromatografia de exclusão	Difusão nos poros	Tamanho molecular
Cromatografia de afinidade	Adsorção bioespecífica	Estrutura molecular
Cromatografia de partição	Equilíbrio de partição	Polaridade

Juntamente com a alta seletividade, outra vantagem das técnicas cromatográficas consiste na utilização de condições brandas de reação. Em geral, essas separações são realizadas sob temperatura ambiente e em soluções tamponadas (Schmidt-Kastner e Golker, 1987).

As separações cromatográficas por adsorção ou troca-iônica permitem que os componentes, presentes no caldo fermentativo, sejam seletivamente distribuídos entre uma fase móvel e uma fase estacionária, como resultado de diferentes interações físico-químicas das substâncias dissolvidas na mistura com o adsorvente.

A adsorção é uma forma de cromatografia sólido-líquido usada desde 1906, na qual as moléculas de soluto e de solvente competem pelos sítios de ligação na superfície do adsorvente. Sendo assim, para ser retida, uma molécula de soluto deve ocupar o lugar de uma molécula de solvente. Se o adsorvente é um material polar (cromatografia de fase normal), as moléculas apolares têm pouca afinidade pelos sítios de ligação e, por isso, são fracamente retidas, enquanto que as moléculas com grupos funcionais polares ou capazes de formar pontes de hidrogênio possuem uma forte afinidade pela superfície do adsorvente. Já os compostos polarizáveis e outros com elétrons  $\pi$  conjugados sofrem interações dipolo-dipolo induzido, sendo que o grau de retenção depende da capacidade de polarização da molécula. Por outro lado, com os adsorventes apolares (cromatografia de fase reversa) as



interações intermoleculares dominantes são as forças de London e desta forma, as substâncias polares e polarizáveis são fracamente retidas (Sewell e Clarke, 1997).

A cromatografia de fase reversa é um método importante para o isolamento e a purificação de produtos químicos e farmacêuticos, a partir de misturas líquidas. As separações em escala industrial de certos produtos biotecnológicos de compostos de estruturas similares, presentes em caldos fermentativos, são conseguidas através de adsorção seletiva, utilizando-se copolímeros de poliestireno-divinilbenzeno (Casillas et al., 1992). Dentre estes adsorventes poliméricos, as resinas da série Amberlite XAD têm sido muito empregadas na análise e separação de compostos orgânicos. As resinas XAD2 e XAD4 apresentam propriedades apolares e hidrofóbicas, mas diferem na área superficial e no diâmetro de poros. Os adsorventes XAD7 e XAD8 são ésteres acrílicos de média polaridade (Andersson e Andersson, 1982) e a resina XAD761 é formada por grupos fenol-formaldeído policondensados (Rohm and Haas, 1995).

Dentre as principais aplicações das resinas Amberlite XAD pode-se citar:

- análise de pequenas quantidades de compostos orgânicos na água;
- análise de compostos orgânicos presentes no ar;
- análise de compostos orgânicos em materiais biológicos;
- análise de fármacos em sangue e extratos de tecidos (Andersson e Andersson, 1982).

Essas resinas mostram algumas vantagens em comparação com os adsorventes clássicos, como carvão ativado e sílica:

- tamanho de partícula e estrutura dos poros regulares;
- boa estabilidade mecânica e térmica;
- fácil regeneração (Mayer et al., 1996).

Como esses adsorventes possuem uma grande habilidade em reter quantidades significativas de compostos orgânicos e possuem características físico-químicas desejáveis eles têm sido utilizados frequentemente em processos de recuperação e purificação de extratos brutos.

A cromatografia de fase reversa era inicialmente empregada somente para a análise de compostos não iônicos ou neutros. No entanto, duas técnicas foram propostas para que

substâncias iônicas e ionizáveis também pudessem ser separadas através desse método: a supressão iônica pelo ajuste do pH da fase móvel e a aplicação de contra-íons (Riley, 1997).

As limitações da supressão iônica levaram ao desenvolvimento, em 1973, de uma técnica com maior aplicabilidade para a separação dos compostos ionizáveis: a cromatografia de par iônico. Essa técnica pode ser utilizada na separação de todas as espécies de compostos orgânicos ionizáveis, íons apróticos como sais de amônio quaternário, sulfonatos e sulfatos orgânicos, bem como para eletrólitos como ácidos carboxílicos, fenóis, aminas e aminoácidos (Eksborg et al., 1973).

Nesta técnica a adição de compostos iônicos à fase móvel promove a formação de pares entre esses íons e as moléculas com carga oposta (Figura 15). Assim, durante a retenção o par iônico formado pode interagir com a superfície do adsorvente (Régis Technologies, 1998).

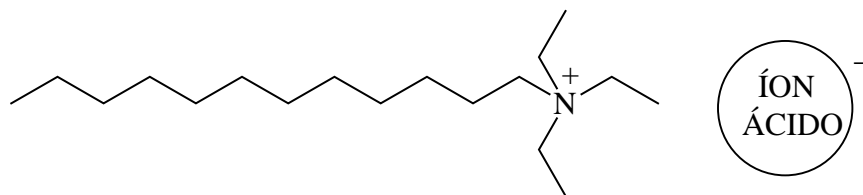


Figura 15. Esquema da interação de um ácido orgânico com um sal de amônio quaternário, funcionando como contra-íon.

Mayer et al. (1996 e 1997) investigaram a purificação de ácido clavulânico por cromatografia de íon par, utilizando sais de amônio quaternário como contra-íons. Uma outra possibilidade a ser investigada seria a utilização de aminoácidos que funcionariam como par iônico na retenção do ácido clavulânico em adsorventes neutros.

No entanto, os compostos iônicos são separados e purificados preferencialmente por cromatografia de troca-iônica. Este tipo de processo baseia-se na distribuição competitiva de uma espécie iônica entre uma fase líquida e uma interface, que possui grupos carregados. Desta forma, a retenção acontece através de interações eletrostáticas entre os íons da fase móvel e os grupos funcionais com carga oposta, imobilizados na superfície do suporte sólido (Riley, 1997). Em alguns casos, há evidências que ocorrem também fenômenos de adsorção na superfície do trocador (Cassidy, 1951).

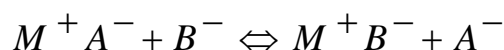
Atualmente, a cromatografia de troca-iônica vem sendo largamente utilizada para concentrar e recuperar produtos biologicamente ativos, a partir do caldo fermentativo (Tabela 7).

Tabela 7. Algumas substâncias biologicamente ativas recuperadas e purificadas por troca-iônica.

<b>Categoria</b>	<b>Exemplos</b>
Antibióticos	Estreptomicina, neomicina, cefalosporinaC
Vitaminas	B <sub>1</sub> , B <sub>6</sub> , B <sub>12</sub> , C
Nucleotídeos	Ácido adenílico, ácido citidílico
Aminoácidos	Lisina, ácido glutâmico, metionina
Proteínas e Enzimas	Albumina, amilase

Um grande número de trocadores iônicos estão disponíveis comercialmente e a maioria deles são polímeros sintéticos, como por exemplo, a resina Amberlite IRA400. A matriz desse adsorvente é um polímero de poliestireno-divinilbenzeno com grupos amônio quaternário ligados, os quais funcionam como grupos trocadores.

Um processo de troca aniônica, como acontece com o ácido clavulânico, em contato com adsorventes carregados positivamente, pode ser representado genericamente como (Harland, 1994):



O grau de interação e retenção nesse tipo de cromatografia depende da natureza dos grupos funcionais da resina e também dos íons a serem separados. O raio iônico, a polarizabilidade, a força iônica, o pH e a presença de íons complexantes na fase móvel têm efeitos significativos no processo de separação (Sewell e Clarke, 1997).

Prasad et al. (1980) investigaram a cinética e o equilíbrio de adsorção da estreptomicina em resinas de troca-iônica (Amberlite IRC50, Indion 236 e KB4-P2). No entanto, estudos cinéticos de adsorção do ácido clavulânico e da influência de fatores como temperatura, pH e força iônica não aparecem na literatura.

Diante de tudo o que foi exposto sobre cromatografia, pode-se dizer que esta técnica apresenta uma grande versatilidade e, por isso, é frequentemente empregada na purificação de compostos biotecnológicos. A caracterização do equilíbrio desses processos

cromatográficos é conseguida através da determinação da afinidade do adsorvente com o composto a ser separado e através do calor envolvido durante o fenômeno de adsorção.

A afinidade de um determinado adsorvente por um adsorvato pode ser obtida experimentalmente através da isoterma de adsorção para o sistema em estudo. Essas isotermas descrevem quantitativamente o equilíbrio de distribuição de um soluto entre as duas fases envolvidas no processo de adsorção, em uma ampla faixa de concentrações.

Numerosas teorias foram desenvolvidas e melhoradas a fim de descrever a adsorção, baseadas em suposições sobre o adsorvente, o processo físico de adsorção e a forma da isoterma. Uma das mais proeminentes dessas teorias foi proposta por Langmuir em 1916, para o fenômeno de adsorção em um sistema gás-sólido. Ele assumiu um calor de interação constante e um número finito de sítios de adsorção. Com essas considerações, a máxima adsorção corresponde a uma monocamada saturada de moléculas do soluto na superfície do adsorvente. Assim, o modelo de Langmuir das monocamadas pode ser descrito pela seguinte equação:

$$q = q_{\max} \frac{C}{C + K_L} \quad (\text{Eq. 2})$$

onde:  $q$  corresponde à quantidade de soluto por unidade de adsorvente,  $C$  é a concentração de soluto no equilíbrio,  $K_L$  é uma constante empírica relacionada a energia de adsorção e  $q_{\max}$  é a quantidade de soluto na saturação. O parâmetro  $q_{\max}$  corresponde a inclinação da isoterma para concentrações baixas de soluto.

Esse modelo vem sendo largamente utilizado para correlacionar dados obtidos em experimentos de adsorção sólido-líquido. Além disso, a isoterma de Langmuir é conveniente para análises quantitativas de processos de adsorção e possui base física, diferentemente de equações empíricas como aquela do modelo de Freundlich (Jacobson et al., 1984).

A equação empírica de Freundlich, limitada para soluções altamente diluídas e moléculas simples, foi descrita como:

$$q = K_F \cdot C^n \quad (\text{Eq. 3})$$

onde:  $q$  corresponde à quantidade de soluto por unidade de adsorvente,  $C$  é a concentração de soluto no equilíbrio,  $K_F$  e  $n$  são parâmetros empíricos (Kamimura, 1995).

Assim, a afinidade que está diretamente relacionada às variações de energia livre do processo de adsorção, pode ser obtida através de uma isoterma. A determinação da variação da entalpia também é uma forma de caracterizar termodinamicamente um determinado fenômeno físico ou químico (Chaubal et al., 1995). Para a medida experimental do calor envolvido no fenômeno da adsorção deve-se empregar a técnica de microcalorimetria.

Através dessa técnica é possível a monitoração de diversos fenômenos, sendo que seu limite de aplicabilidade está limitado à imaginação do investigador e à habilidade para se controlar o experimento. O princípio dessa técnica é o monitoramento, com o passar do tempo, do calor liberado ou absorvido durante um determinado processo.

As aplicações da microcalorimetria nas ciências farmacêuticas pode ser dividida em três áreas principais: processos biológicos, reações químicas e fenômenos físicos. Assim, é possível acompanhar-se os processos metabólicos dos microrganismos e os fenômenos físicos de adsorção, propriedades de cristais, dissolução, entre outros também podem ser caracterizados através da microcalorimetria (Buckton, 1995).

### 3. RELEVÂNCIA DO TRABALHO

Através da revisão bibliográfica apresentada, pode-se constatar que existem pouquíssimas referências disponíveis na literatura relativas a processos de separação e/ou purificação de ácido clavulânico. Desta forma, através das etapas realizadas durante o desenvolvimento do presente trabalho, objetivou-se a busca por condições operacionais que melhorassem o processo em batelada de recuperação do produto por adsorção sobre resinas. Essas etapas aparecem listadas a seguir:

- Determinação da região de pH de maior estabilidade do ácido clavulânico em solução aquosa, através da estimativa das constantes de hidrólise em diferentes valores de pH.
- Investigação da cinética de adsorção do ácido clavulânico em resinas neutras (Amberlite XAD4 e Amberlite XAD761) e em uma resina de troca-iônica (Amberlite IRA400).
- Estudo termodinâmico do processo de adsorção através da determinação da variação de entalpia pela técnica de microcalorimetria e através da obtenção da afinidade da resina IRA400 pelo ácido clavulânico.
- Determinação da influência de parâmetros (força iônica, pH, concentração de resina, temperatura) na adsorção do presente composto em IRA400.

Torna-se importante salientar que estes estudos são inéditos na literatura e que poderão contribuir para a otimização do isolamento e purificação de ácido clavulânico presente no caldo fermentativo.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. Equipamentos

- Espectrofotômetro digital UV/VIS Pharmacia Biotech Ultrospec 2000
- Balança analítica digital OHAUS Explorer
- pHmetro digital Micronal B474
- Banho termostatizado Ética
- Banho termostatizado MLW MK70
- Agitador magnético Corning Stirrer/Hot Plate
- Mesa incubadora rotativa New Brunswick Scientific
- Pipetas automáticas: Eppendorf (100-1000 $\mu$ L) e Finpippete (1-5 mL)
- Termobalança TA Instruments SDT 2960 Simultaneous DTA-TGA.
- Cromatógrafo líquido de alta eficiência Waters modelo 510 com detector espectrofométrico UV modelo 486, injetor Rheodyne 7125 com loop de 20 $\mu$ L, coluna (3,9 $\times$ 300mm) e pré coluna cromatográficas C-18  $\mu$ Bondapack Waters para a análise de ácido clavulânico
- Cromatógrafo líquido de alta eficiência para análise de aminoácidos Shimadzu LC-10A/C-R7A
- Microcomputador Pentium 266 MMX, utilizado na análise dos dados

### 4.2. Reagentes

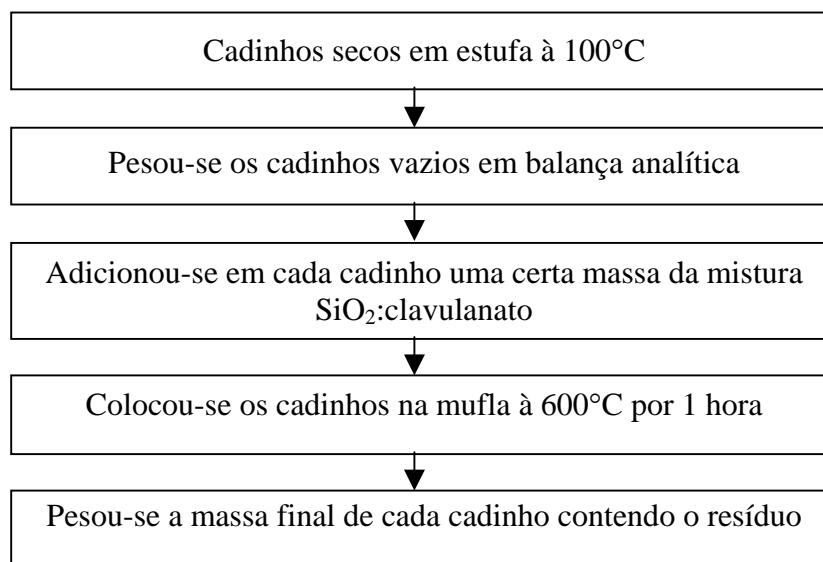
- Mistura de clavulanato de potássio e dióxido de silício (1:1) gentilmente cedida pela Gist Brocades (Delft-Holanda)
- Resinas Amberlite IRA400 (Sigma) e Amberlite XAD4 e XAD 761 (Rohm and Haas)
- Imidazol Mallinckrodt Chemical (utilizado na determinação da concentração de ácido clavulânico por espectrofotometria a 312 nm)
- Dióxido de silício cedido pela farmácia de manipulação Santa Paula (utilizado nos experimentos de determinação da entalpia de adsorção)
- Aminoácidos e reagentes para preparo das soluções tampão, ajuste da força iônica e ativação das resinas foram de grau analítico.

### 4.3. Metodologia

#### 4.3.1. Determinação da porcentagem de ácido clavulânico na mistura

As soluções de ácido clavulânico foram preparadas a partir de uma mistura 1:1 de clavulanato de potássio e dióxido de silício (separado através de filtração a vácuo).

Para a determinação da porcentagem exata de ácido clavulânico, presente nessa mistura, realizou-se uma calcinação a 400°C durante 20 minutos (Esquema 1).



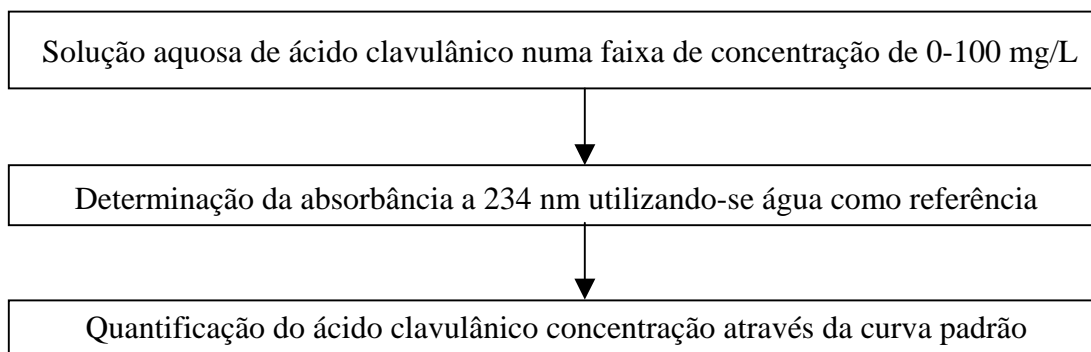
Esquema 1. Determinação da porcentagem de ácido clavulânico de potássio na mistura 1:1 SiO<sub>2</sub>/clavulanato por calcinação a 400°C.

Além disso, uma análise termogravimétrica (TG) foi efetuada no Departamento de Química Analítica. A amostra foi aquecida de 30 a 900°C a uma velocidade de 20°C/min e a atmosfera do forno foi mantida com ar sintético a uma vazão de 100 mL/min. Essa mistura foi ainda submetida a uma análise por CLAE, no Departamento de Engenharia Química da UFSCar, sob as seguintes condições de operação: temperatura de 28°C, vazão de 1,5 mL/min, detecção a 227 nm e tempo de corrida de 8 minutos. O eluente era composto de uma solução de fosfato de potássio monobásico (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) a 50mM e pH 4,5. A curva de calibração foi obtida, utilizando-se soluções padrão de clavulanato de potássio preparadas a partir do medicamento Clavulin (125 mg de ácido clavulânico e 500 mg de amoxicilina), disponível comercialmente.



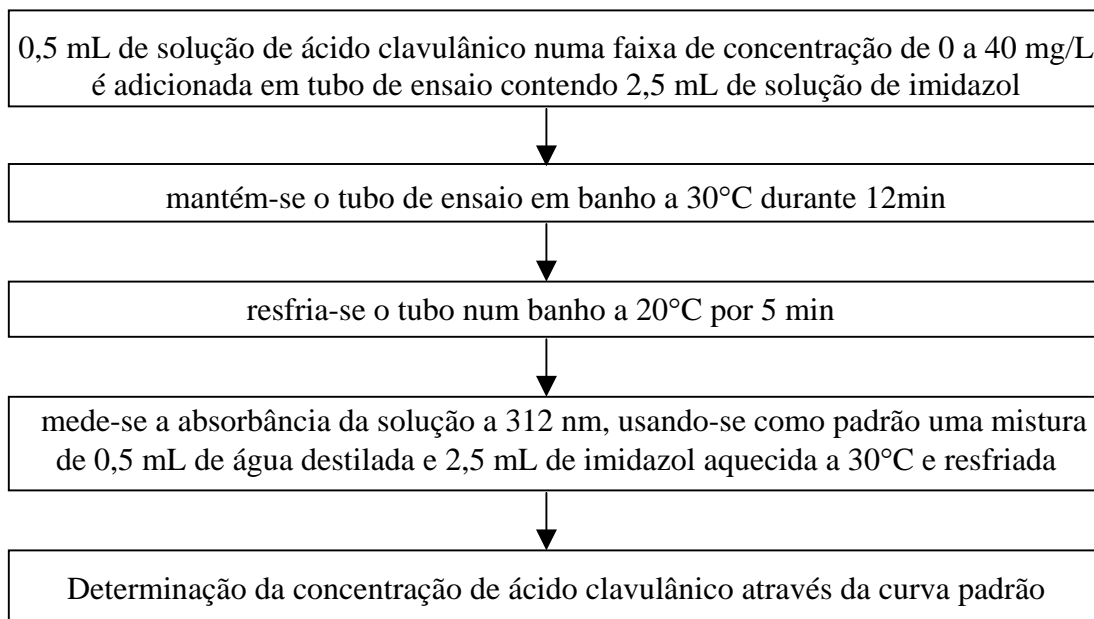
#### 4.3.2. Quantificação de ácido clavulânico

Para a determinação quantitativa de ácido clavulânico, presente em solução aquosa, utilizou-se a técnica de espectrofotometria UV a 234 nm (Esquema 2).



Esquema 2. Quantificação direta de ácido clavulânico por espectrofotometria UV a 234 nm.

Nos estudos de hidrólise e em outros, onde estavam presentes substâncias que absorvem radiação eletromagnética a 234 nm, a quantificação de ácido clavulânico foi realizada através da reação com solução de imidazol 60 g/L e pH 6,8 (Bird et al., 1982) (Esquema 3). A molécula de imidazol, sob condições adequadas, reage com o ácido clavulânico, produzindo um composto estável com intensa absorbância a 312 nm (Figura 16).



Esquema 3. Quantificação de ácido clavulânico pelo método da reação com imidazol.

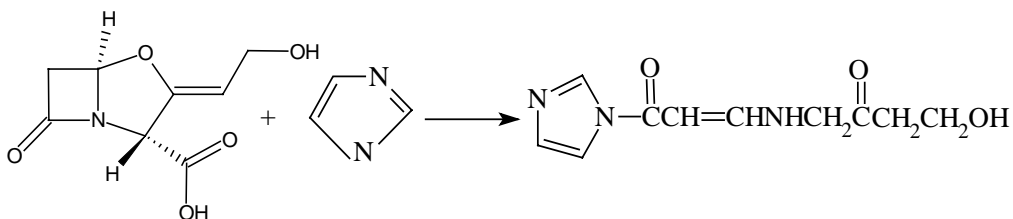
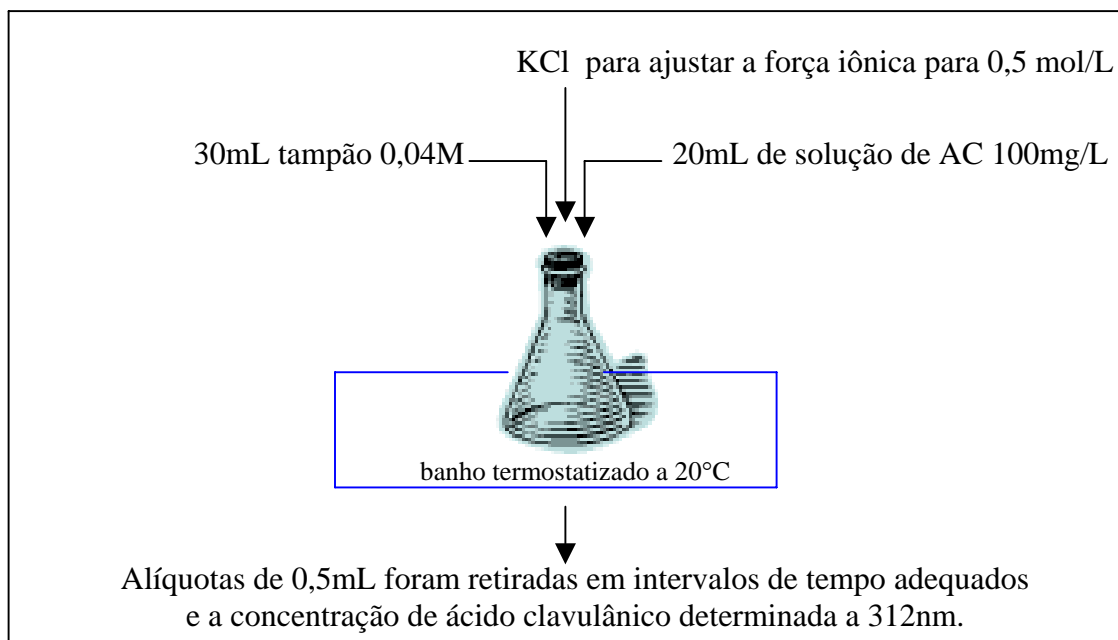


Figura 16. Esquema da reação do imidazol com o ácido clavulânico.

#### 4.3.3. Investigação da estabilidade do ácido clavulânico em solução aquosa

Os estudos cinéticos de hidrólise do ácido clavulânico em solução aquosa foram realizados à temperatura de 20°C, mantida constante através de um banho termostatizado e variando-se o pH. Em erlenmeyers de 125 mL, foram adicionados 20 mL de solução de ácido clavulânico a uma concentração inicial ( $C_0$ ) de 100 mg/L, 30 mL de solução tampão 0,04M (Tabela 8) e uma certa massa de cloreto de potássio (Tabela 9) para ajustar a força iônica para 0,5 mol/L (Méndez et al., 1992). Em intervalos de tempo adequados foram retiradas alíquotas de 0,5 mL e a concentração de ácido clavulânico não degradado foi determinada através do método da reação com imidazol (Esquema 4).



Esquema 4. Determinação da velocidade de hidrólise do ácido clavulânico em função do pH.

Tabela 8. Soluções tampão utilizadas nos experimentos de hidrólise do ácido clavulânico.

<b>Tampão</b>	<b>Volumes das soluções usadas no preparo de 100 mL de tampão 0,04M</b>	<b>pH</b>
HCl/KCl	3,35 mL de HCl 0,2M	2,42
Ácido acético	30,87 mL HAc 0,1M + 9,95mL KOH 0,1M	4,22
Fosfato	49,2 mL KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,061M + 16,94 mL Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0,061M	6,20
Borato	16,62 mL H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> 0,185M + 20 mL Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> 0,0463M	8,69
Carbonato	17,41 mL NaHCO <sub>3</sub> 0,1M + 21,89 mL Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> 0,1M	9,95

Tabela 9. Massas de cloreto de potássio utilizadas para ajustar a força iônica.

<b>pH</b>	<b>Massa de cloreto de potássio, g</b>
2,42	1,8488
4,22	1,8414
6,21	1,7284
8,32	1,7948
9,95	1,6741

#### 4.3.4. Preparação das fases estacionárias

As propriedades físicas das resinas utilizadas nos estudos de adsorção do ácido clavulânico (Tabela 10) foram determinadas no CCDM do Departamento de Engenharia de Materiais da UFSCar.

Tabela 10. Propriedades físicas das resinas utilizadas nos estudos de adsorção do ácido clavulânico.

<b>Resina</b>	<b>Área Superficial, m<sup>2</sup>/g</b>	<b>Densidade, g/mL</b>	<b>Volume de poro</b>
Amberlite IRA400	1,104	1,117	não definido
Amberlite XAD4	711,656	1,113	0,368
Amberlite XAD761	170,105	1,164	0,201

A resina de troca-iônica IRA400 foi tratada com íons cloreto. Para ativação, esse trocador foi deixado em contato com solução de NaCl 5% (p/v), durante 30 min em agitador magnético e, em seguida, lavou-se com água destilada. As resinas XAD4 e XAD761 foram deixadas durante 30 min em contato com metanol e depois lavadas extensivamente com água destilada.

#### 4.3.5. Quantificação de aminoácidos

A quantificação de fenilalanina, empregada como contra-íon para o ácido clavulânico, foi realizada por espectrofotometria UV a 266 nm.

Para a determinação de arginina e lisina foi utilizado um cromatógrafo líquido de alta eficiência do Departamento de Engenharia Química da UFSCar, específico para a análise de aminoácidos. Neste método, o-ftalaldeído (OPA) reage rapidamente, na presença de compostos tiólicos (-SH), com o grupo amino (-NH<sub>2</sub>) dos aminoácidos, produzindo uma substância intensamente fluorescente (Figura 17). Esta derivatização com OPA e posterior detecção por fluorimetria permitem uma seletiva determinação de cada aminoácido com alta sensibilidade (Ishida et al., 1981; Dorresteyjn et al., 1996).

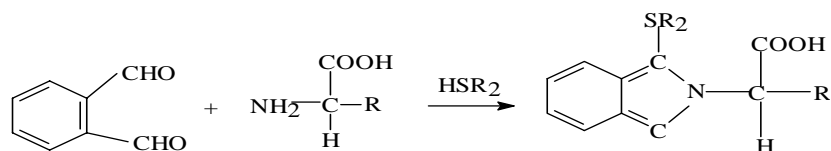
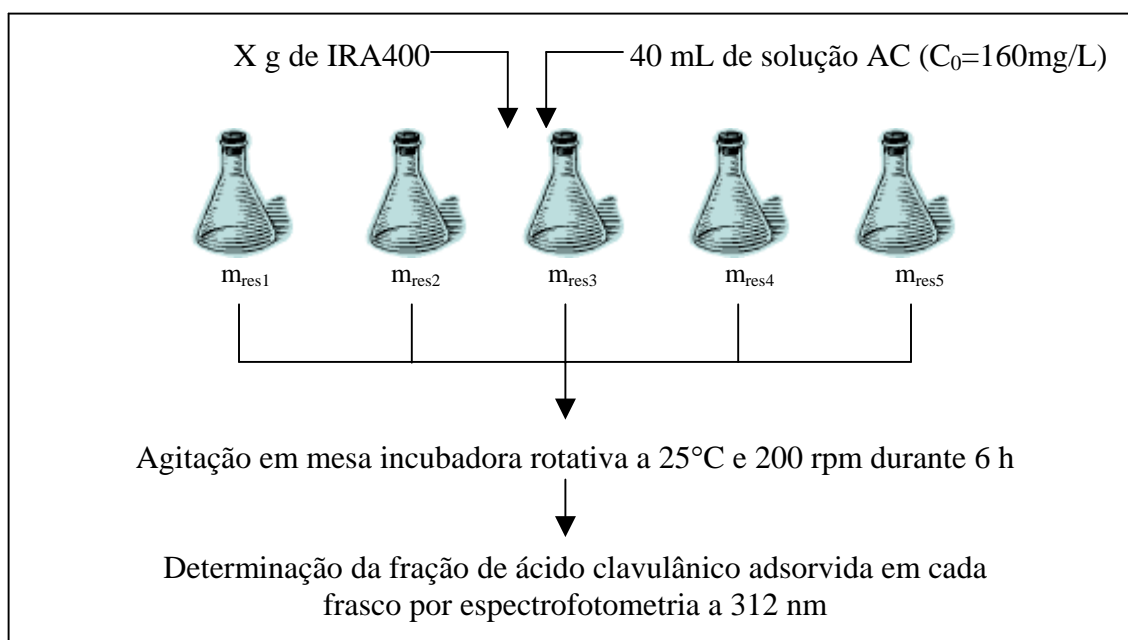


Figura 17. Reação de um aminoácido genérico e OPA, com formação de um produto altamente fluorescente.

#### 4.3.6. Determinação da massa de resina adequada aos estudos de adsorção em batelada

40 mL de uma solução de ácido clavulânico foram colocados em contato com massas diferentes das resinas IRA400 (0,02; 0,07; 0,12; 0,17 e 0,22 g) e XAD761 (0,02; 0,07; 0,12; 0,17; 0,22; 0,36 e 0,50 g). Após 6 horas (Mayer et al., 1996), determinou-se a absorbância do sobrenadante a 312 nm (Esquema 5). O método analítico da reação com imidazol foi utilizado, uma vez que, a curva padrão a 234 nm ainda não tinha sido obtida.



Esquema 5. Determinação da massa de resina adequada para a adsorção em batelada do ácido clavulânico.

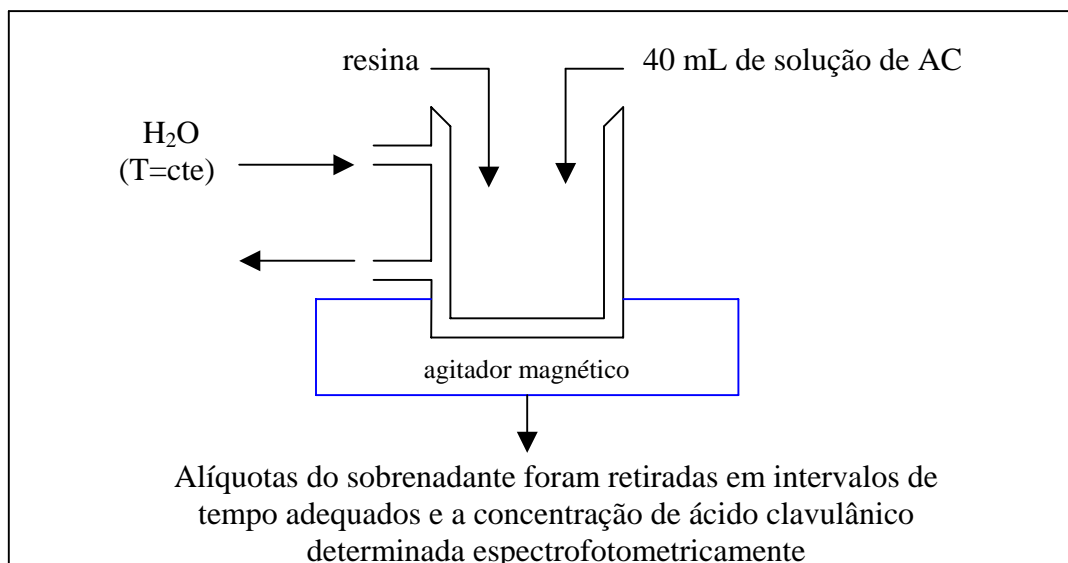
#### 4.3.7. Investigação da cinética de adsorção do ácido clavulânico em resinas

Num reator, conectado a um banho termostatizado, adicionaram-se 120 mL de uma solução de ácido clavulânico e uma certa massa de resina (Tabela 11). Com o passar do tempo, foram sendo retiradas alíquotas de 0,5 mL da solução sobrenadante e a concentração de ácido clavulânico determinada por espectrofotometria a 234 nm (Esquema 6).

No caso do sistema de par iônico ácido clavulânico/fenilalanina, utilizou-se o método da reação com imidazol, uma vez que o respectivo aminoácido também absorve radiação eletromagnética a 234nm. Nesse experimento deixou-se a resina XAD4 em contato com uma solução de fenilalanina 0,01M em mesa incubadora rotativa, durante 24 horas. Em seguida, determinou-se a concentração do aminoácido adsorvida por espectrofotometria a 266 nm. Assim, o sistema resina/fenilalanina foi colocado em contato com uma solução de ácido clavulânico, contendo a mesma concentração do aminoácido adsorvida e a cinética do processo foi acompanhada.

Tabela 11. Concentração de resina e concentração inicial de ácido clavulânico utilizadas nos diferentes experimentos cinéticos de adsorção.

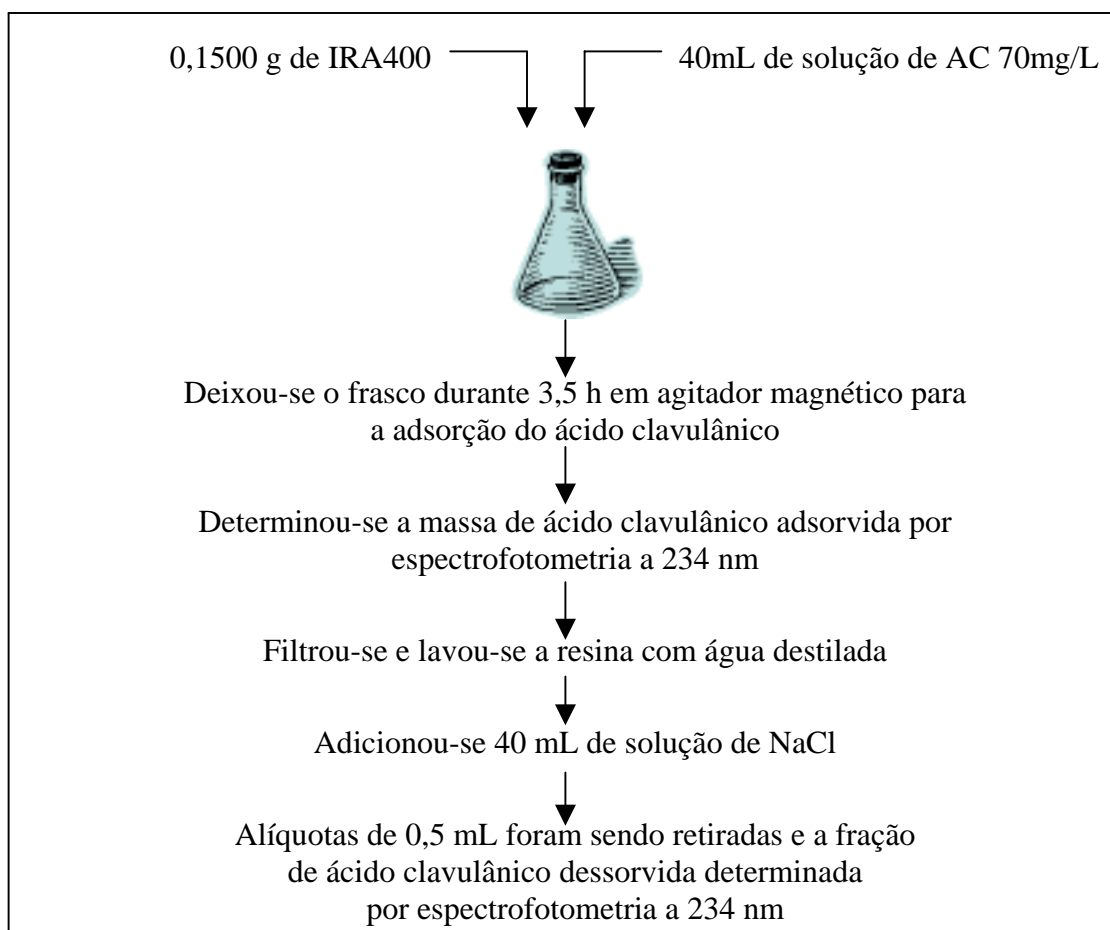
<b>Experimento</b>	<b>T, °C</b>	<b>C<sub>res</sub>, g/L</b>	<b>C<sub>0</sub>, g/L</b>
XAD4 e XAD761 (pH6,5)	26	62,5	1,0
XAD761 e XAD4 (pH 4,5)	26	62,5	1,0
XAD4/fenilalanina	26	62,5	0,5
IRA400	22, 26, 30	3,75	0,07



Esquema 6. Experimentos cinéticos de adsorção do ácido clavulânico em resinas.

#### 4.3.8. Experimentos de dessorção do ácido clavulânico da resina IRA400

Para a investigação da velocidade de dessorção do ácido clavulânico da resina IRA400, realizou-se inicialmente a adsorção deste composto. Para isso, deixou-se 0,1500g do adsorvente em contato com 40 mL de uma solução de ácido clavulânico ( $C_0=70$  mg/L), durante 3,5 h, para se atingir o equilíbrio. Em seguida, determinou-se a concentração adsorvida e eliminou-se a solução por filtração e lavagem da resina. Para a dessorção foram adicionados 40 mL de solução de NaCl 5 e 10% (p/v) à resina, contendo o ácido clavulânico adsorvido e, com o passar do tempo, foram sendo retiradas alíquotas do sobrenadante, para a determinação da concentração de ácido clavulânico livre (Esquema 7).

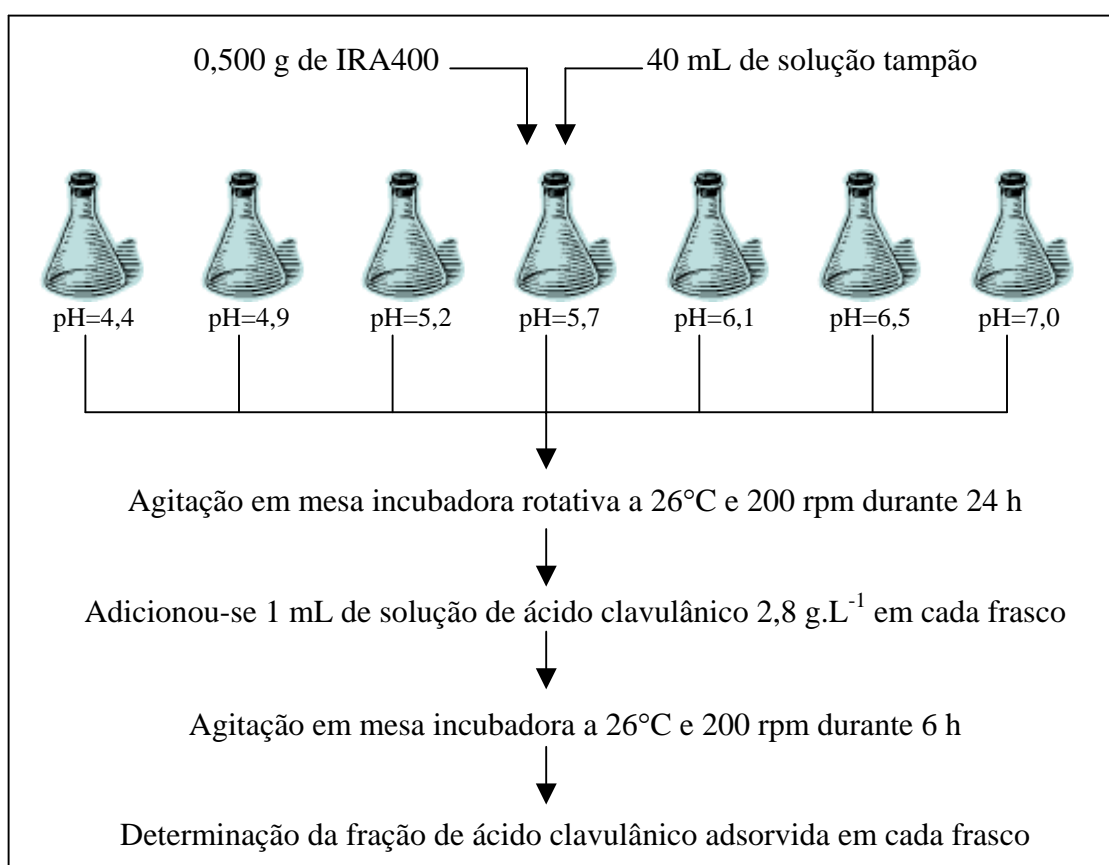


Esquema 7. Experimentos de dessorção do ácido clavulânico da resina IRA400 com NaCl 5 e 10% (p/v).

#### 4.3.9. Influência do pH na adsorção do ácido clavulânico em IRA400

Para a investigação da influência do pH na fração de ácido clavulânico adsorvida ( $C_{ads}/C_0$ ) em IRA400 foram utilizadas soluções tampão citrato/fosfato 0,2 M (Gomori,

1955) com força iônica igual a 0,25 mol/L, na faixa de pH de 4,5 a 7,0 (região na qual o ácido clavulânico apresenta maior estabilidade frente à degradação). Nesse experimento foram colocados 40 mL de solução tampão em erlenmeyers de 125 mL e 0,5000 g de IRA400, deixando-se em mesa incubadora rotativa, durante 24 h, para se atingir o equilíbrio. Adicionou-se, então, 1 mL de uma solução de ácido clavulânico ( $C_0=2,8$  g/L), para que a concentração inicial no frasco ficasse em torno de 70 mg/L. Esses erlenmeyers foram mantidos a 25°C e 200 rpm durante 6 h e a concentração de ácido clavulânico foi determinada por espectrofotometria a 234 nm (Esquema 8).



Esquema 8. Determinação da influência do pH na adsorção do ácido clavulânico em IRA400.

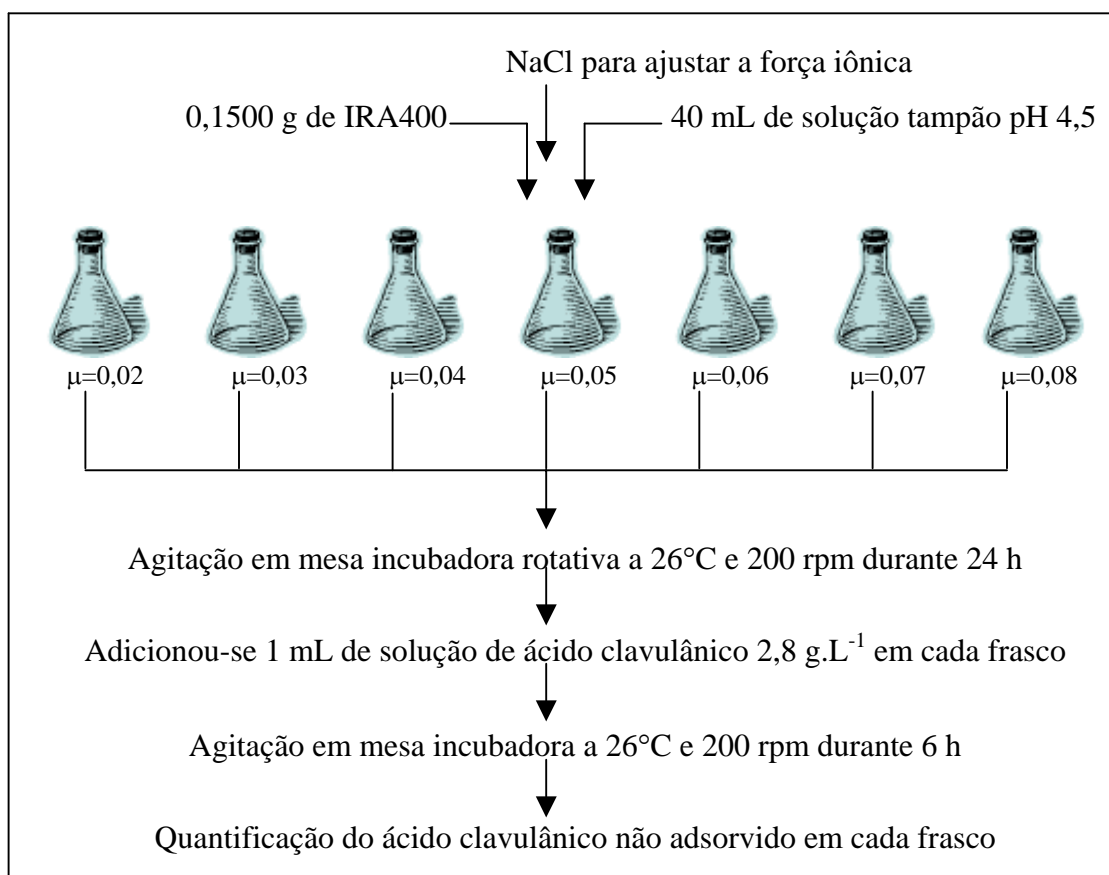
#### 4.3.10. Influência da força iônica na adsorção do ácido clavulânico em IRA400

Para se verificar a influência da força iônica na fração de ácido clavulânico adsorvida em IRA400 empregou-se o tampão ácido acético/acetato de sódio 0,05 M, pH 4,5 e força iônica na faixa de 0,02 a 0,08, ajustada com cloreto de sódio (Tabela 12). Assim,

foram colocados 40 mL da solução tampão em contato com 0,1500 g de resina e os frascos mantidos em mesa incubadora rotativa, durante 24 h, para se atingir o equilíbrio. Após esse tempo, adicionou-se 1 mL de solução de ácido clavulânico 2,8 g/L, para que a concentração em cada frasco ficasse em torno de 70 mg/L. Esses frascos foram então mantidos a 26°C e 200 rpm, durante 6 h. A quantificação de ácido clavulânico para cada valor de força iônica foi realizada por espectrofotometria a 234 nm (Esquema 9).

Tabela 12. Massas de cloreto de sódio adicionadas para se obter valores de força iônica diferentes.

Força iônica, mol/L	Massa de NaCl adicionada, g
0,023	0
0,033	0,0234
0,043	0,0468
0,053	0,0701
0,063	0,0935
0,073	0,1169
0,083	0,1403



Esquema 9. Determinação da influência da força iônica na adsorção do ácido clavulânico em IRA400.



#### 4.3.11. Influência da concentração inicial de ácido clavulânico na adsorção em IRA400

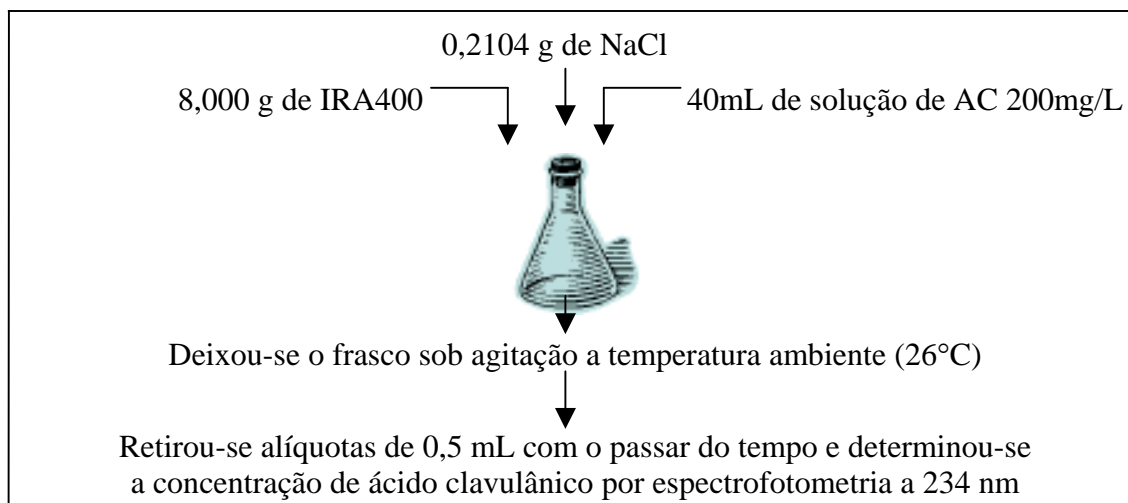
Para a determinação da influência da concentração inicial de ácido clavulânico na velocidade de adsorção foi utilizado o mesmo frasco encamisado mostrado no item 4.3.7, sendo a temperatura mantida a 26°C. Em todos os experimentos foi utilizada uma relação  $C_{res}/C_0$  igual a 53,57 e assim os valores de concentração inicial de ácido clavulânico e concentração de resina são mostrados na Tabela 13. Com o passar do tempo, alíquotas de 0,5 mL eram retiradas para a determinação da concentração de ácido clavulânico livre.

Tabela 13. Valores da concentração inicial de AC e da massa de resina utilizadas nos experimentos para a determinação da influência da concentração inicial na velocidade de adsorção em IRA400.

Experimento	Concentração inicial de AC, mg/L	Massa de resina, g
1	200	1,29
2	380	2,44
3	690	4,44
4	1000	6,43

#### 4.3.12. Cinética de adsorção em IRA400 em condições próximas às reais

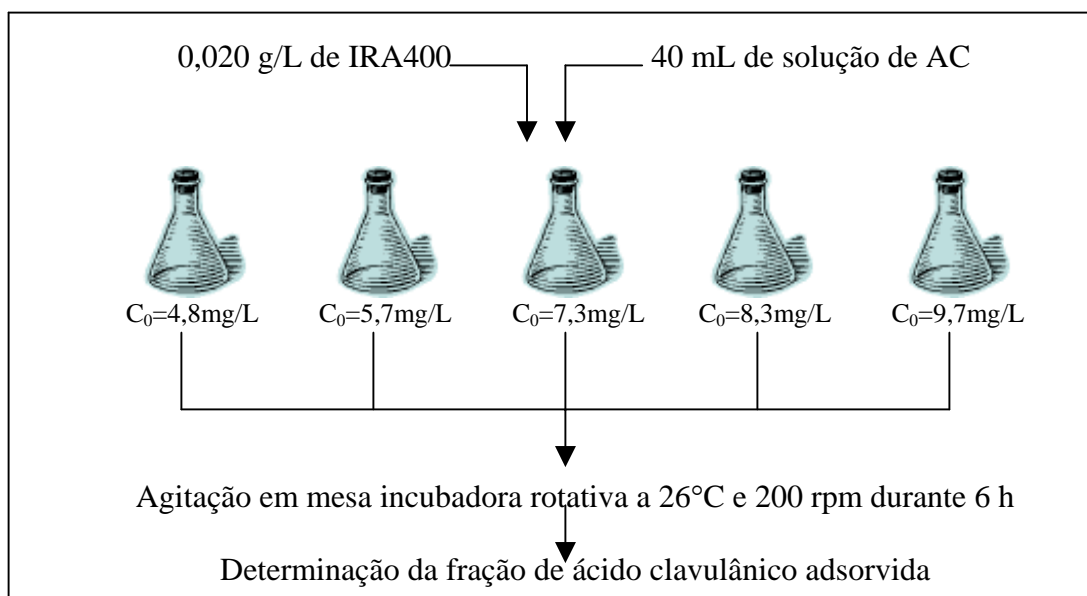
Para esse experimento foram utilizadas condições próximas às presentes no caldo fermentativo sintético, utilizado em nossos laboratórios. Assim, num erlenmeyer, sob agitação, adicionaram-se 40 mL de solução de ácido clavulânico 200 mg/L, 8,000 g de IRA400 ( $C_{res}/C_0=1000$ ) e 0,2104 g de NaCl para ajustar a força iônica para 0,09. Com o passar do tempo, retiravam-se alíquotas de 0,5 mL do sobrenadante e a concentração de ácido clavulânico era determinada por espectrofotometria a 234 nm (Esquema 10).



Esquema 10. Cinética de adsorção do ácido clavulânico em IRA400 em condições próximas às reais.

#### 4.3.13. Isoterma de adsorção em IRA400

Para a obtenção da isoterma de adsorção do ácido clavulânico, 2 mg de IRA400 foram colocados em erlenmeyers e deixados em contato com soluções de ácido clavulânico de diferentes concentrações iniciais (5-10 mg/L). Os frascos foram então mantidos em mesa incubadora rotativa a 25°C e 200 rpm, durante 6 h. Após esse tempo decorrido, a concentração de ácido clavulânico em cada frasco foi determinada a 234nm e, por balanço material, calculou-se a massa do composto adsorvida na resina (Esquema 11).



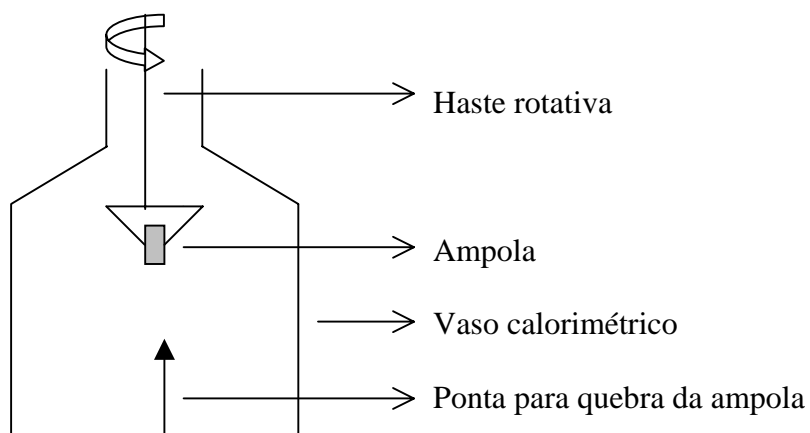
Esquema 11. Experimento para a determinação da isoterma de adsorção de ácido clavulânico em IRA400.

#### 4.3.14. Determinação da entalpia de adsorção

A energia liberada na adsorção de qualquer composto em resinas é muito pequena, por isso empregou-se a técnica de microcalorimetria isotérmica, a qual pode ser utilizada na investigação de uma grande variedade de processos químicos e físicos (Buckton e Beezer, 1991; Buckton, 1995). As determinações dos calores de adsorção do ácido clavulânico em diferentes resinas neutras e de troca-iônica foram realizadas no Instituto de Química da Unicamp.

Esses experimentos foram conduzidos a 25°C, utilizando-se o microcalorímetro Precision Solution Calorimeter Thermometric 2225, pela quebra de uma ampola de vidro,

contendo a mistura de clavulanato de potássio e sílica. Assim, havia o contato desses compostos com 4 g da resina em 70 mL de água deionizada, dentro do vaso calorimétrico. A solução é mantida homogênea através de uma haste rotativa que também serve para segurar a ampola (Esquema 12). No momento da quebra, o calor liberado, como resultado do processo de adsorção e de dissolução da mistura em água, foi monitorado pelo calorímetro.

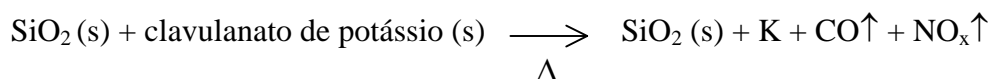


Esquema 12. Representação do vaso calorimétrico com a ampola contendo a mistura.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Determinação da porcentagem de ácido clavulânico na mistura

Para a determinação da porcentagem de ácido clavulânico na mistura 1:1 inicialmente realizou-se uma calcinação, tendo em vista o fato que esse composto decompõe-se a 161°C. Sendo assim, um aquecimento a 400°C em mufla leva à total decomposição e perda de massa na forma de produtos voláteis, como CO e NO<sub>x</sub> e o resíduo sólido que permanece nos cadinhos é composto pelo dióxido de silício (SiO<sub>2</sub>) e pelo potássio:



Os dados obtidos (Tabela 14) mostraram que a perda de massa está em torno de 41,6%.

Tabela 14. Dados de massa perdida durante a calcinação a 400°C da mistura 1:1 de clavulanato de potássio e SiO<sub>2</sub>.

Amostra	Massa de mistura, g	Massa perdida, g	% perdida
1	0,2505	0,1047	41,796
2	0,2502	0,1043	41,687
3	0,2502	0,1034	41,327

No valor da massa perdida durante o aquecimento pode estar computada uma certa fração de água, que foi absorvida pela sílica. Desta forma, para se ter um conhecimento do perfil da decomposição térmica realizou-se uma análise termogravimétrica. Pelo termograma (Figura 18) pode-se notar uma perda de água, de aproximadamente 6%, em temperaturas menores que 100°C. A 200°C ocorre uma perda de massa a temperatura constante, o que é característico de fenômenos de mudança de estado. De 230 a 450°C, nota-se uma outra queda na massa, caracterizando assim um processo de decomposição. Devido ao fato de não se conhecer as reações que acontecem nessa última etapa e nem a composição exata do resíduo, não foi possível a determinação precisa da porcentagem de clavulanato na mistura através dessa técnica.

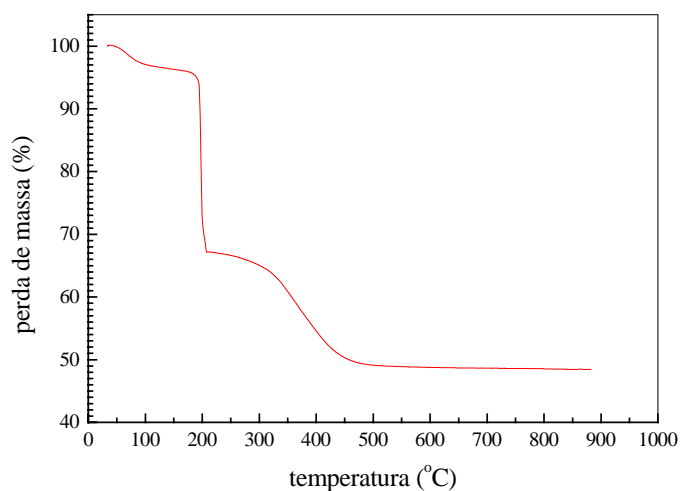


Figura 18. Termograma de 3,3298 mg da mistura de clavulanato de potássio e sílica, obtido em atmosfera de ar sintético a 100 mL/min e com velocidade de aquecimento de 20°C/min.

Assim, buscou-se uma outra técnica para a determinação da porcentagem de clavulanato e através da cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foi possível a quantificação desse composto, usando-se como padrão o medicamento Clavulin (125 mg e clavulanato de potássio e 500 mg de amoxicilina), disponível comercialmente. Os dados obtidos por cromatografia para uma solução 100 mg/L da mistura de clavulanato de potássio e sílica mostraram que a porcentagem de ácido clavulânico está em torno de 39%.

## 5.2. Curvas padrão para quantificação de ácido clavulânico

O ácido clavulânico pode ser detectado e quantificado utilizando-se diversas técnicas, como por exemplo, por bioensaio, através de sua propriedade inibitória de  $\beta$ -lactamases, por cromatografia líquida de alta eficiência (Foulstone e Reading, 1982; Haginaka et al., 1986; Martín e Méndez, 1988; Low et al., 1989). No entanto, a maioria destes métodos são trabalhosos e voltados para a determinação do clavulanato presente em misturas complexas (plasma, urina, caldo fermentativo). Como nos estudos de adsorção e estabilidade do presente trabalho foram utilizados meios simples (geralmente soluções aquosas contendo somente ácido clavulânico), empregou-se a técnica de espectrofotometria UV para a quantificação deste composto.

Assim, nos estudos de hidrólise do ácido clavulânico empregou-se a metodologia proposta por Bird et al. (1982), baseada na determinação da absorbância a 312 nm do seu produto de reação com imidazol, a qual é específica para a quantificação desse inibidor na presença de seus produtos de degradação.

A curva padrão obtida experimentalmente (Figura 19) pode ser utilizada para a determinação de ácido clavulânico na faixa de 0-40 mg/L e seu coeficiente angular coincide com aquele apresentado por Bird et al.(1982). Isso veio mostrar que este método apresenta uma boa reprodutibilidade quando as condições de reação (temperatura e tempo de aquecimento, pH) são mantidas constantes.

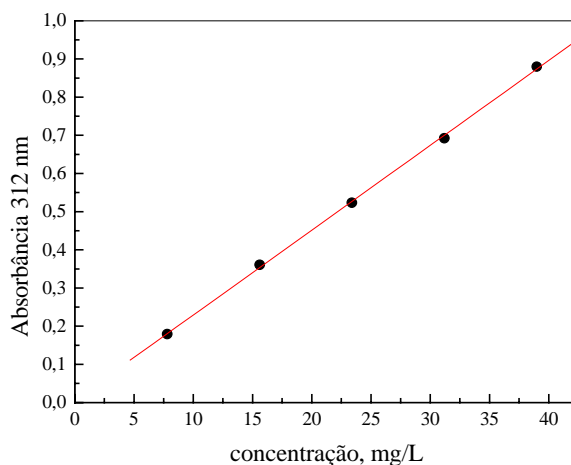


Figura 19. Curva padrão para a quantificação de ácido clavulânico através do método espectrofotométrico da reação com imidazol.

A equação que representa a curva padrão experimental é a seguinte:

$$\text{Absorbância} = 0,0071 + 0,0222 C$$

onde C corresponde à concentração de ácido clavulânico presente em solução.

O presente método pode ser empregado somente em casos nos quais não estejam presentes em solução substâncias que são capazes de reagir com o imidazol.

Como os experimentos de adsorção do presente trabalho foram conduzidos em soluções aquosas contendo somente ácido clavulânico, a quantificação desse composto  $\beta$ -lactâmico pôde ser realizada sem a derivatização com imidazol.

Observando-se o espectro de absorção de 200 a 400 nm de uma solução de ácido clavulânico 15 mg/L (Figura 20), nota-se que em 234 nm o valor de absorbância está em torno de 0,114. Desta forma, nesse comprimento de onda consegue-se uma quantificação adequada de soluções até 100 mg/L e uma curva padrão foi obtida através desse método espectrofotométrico direto (Figura 21).

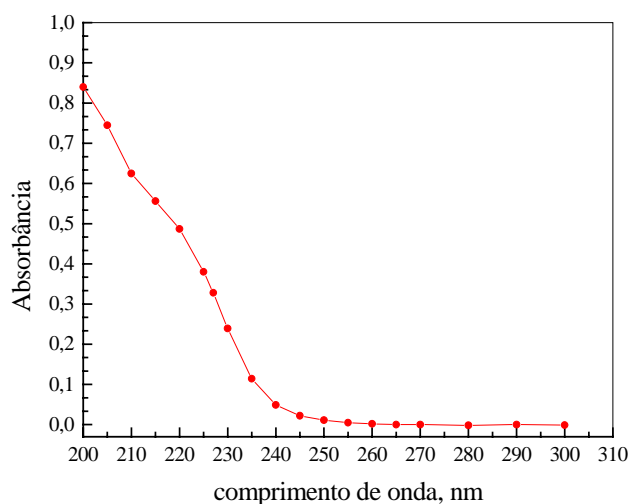


Figura 20. Espectro UV de uma solução de ácido clavulânico 15 mg/L.

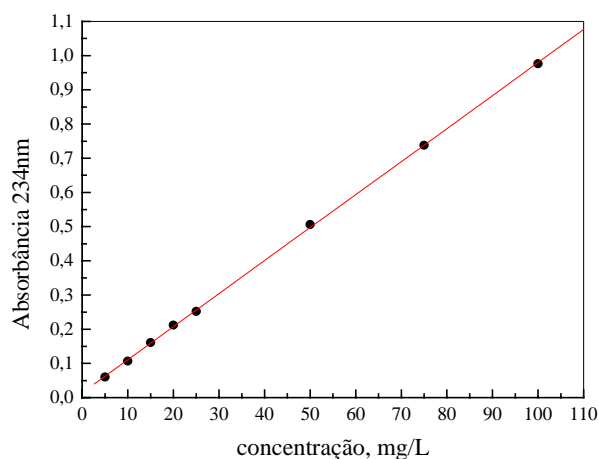


Figura 21. Curva padrão para a quantificação de ácido clavulânico por espectrofotometria a 234 nm.

Os dados experimentais ajustaram-se a seguinte equação de reta, que foi utilizada na quantificação de soluções de ácido clavulânico de uma maneira rápida e simples:

$$\text{Absorbância} = 0,01457 + 0,00965 C$$

### 5.3. Determinação da estabilidade do ácido clavulânico em função do pH

Os dados experimentais de concentração de ácido clavulânico não degradado em função do tempo mostraram que a degradação deste inibidor, em solução aquosa, comporta-se como uma reação de pseudo primeira ordem, assim como acontece com a decomposição de outros compostos  $\beta$ -lactâmicos (Konecny et al., 1975; Mendéz et al., 1992; Okamoto et al., 1996).

Os valores de concentração de ácido clavulânico não degradado em função do tempo, nos cinco valores de pH estudados, são mostrados na Tabela 15.

Tabela 15. Valores de concentração de ácido clavulânico não degradado (C) em função do tempo nos diversos pHs estudados.

pH=2,42		pH=4,22		pH=6,20		pH=8,69		pH=9,95	
t, h	C, mg/L	t, h	C, mg/L	t, h	C, mg/L	t, h	C, mg/L	t, h	C, mg/L
0	38,9	0	38,2	0	39,8	0	38,5	0	38,6
0,33	34,5	1,0	37,7	7,83	38,5	1,5	37,2	0,33	36,8
0,67	31,4	2,0	37,5	16,8	36,8	3,0	36,0	0,83	31,2
1,00	27,8	3,5	37,2	24,0	35,7	5,0	34,8	1,33	26,3
1,38	25,0	4,5	36,9	31,8	34,9	7,0	32,9	1,83	24,0
1,88	21,7	5,5	36,6	41,6	33,7	9,0	31,6	2,33	19,9
2,38	18,2	6,5	36,2	48,0	33,1	11,0	30,4	2,83	17,1
2,88	16,2	7,5	35,8	55,4	32,0	12,5	29,6	3,88	13,6
3,38	14,0	8,5	35,5	65,3	30,6	14,0	29,0	4,33	11,8
4,13	12,2	12,5	34,2					4,83	10,6
4,88	10,0	24,0	30,5					5,33	9,3
5,63	8,2							5,83	7,9

O ajuste do modelo de primeira ordem é mostrado nas Figuras 22, 23 e 24, que apresentam dados de  $C/C_0$  em função do tempo para os valores de pH considerados.

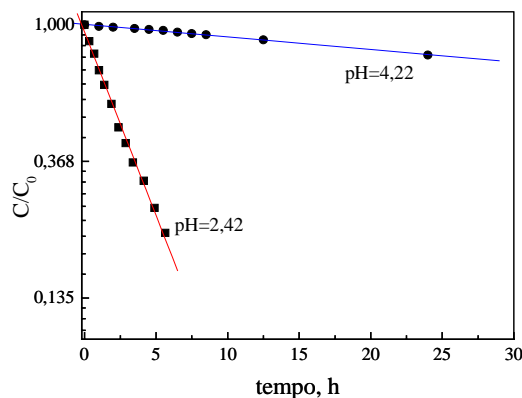


Figura 22. Degradação do ácido clavulânico em função do tempo em pHs 2,42 e 4,22 a 20°C e  $\mu=0,5\text{mol/L}$ .



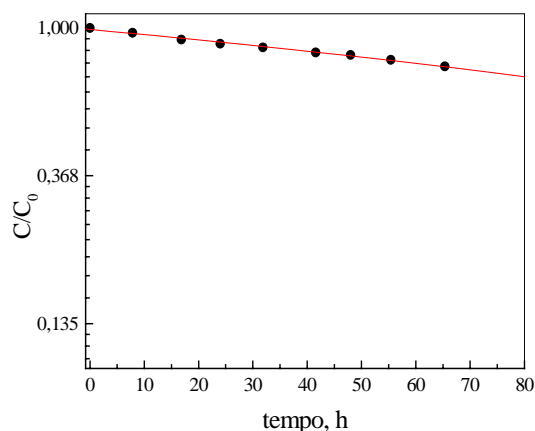


Figura 23. Degradação do ácido clavulânico em função do tempo em pH 6,20 a 20°C e  $\mu=0,5\text{mol/L}$ .

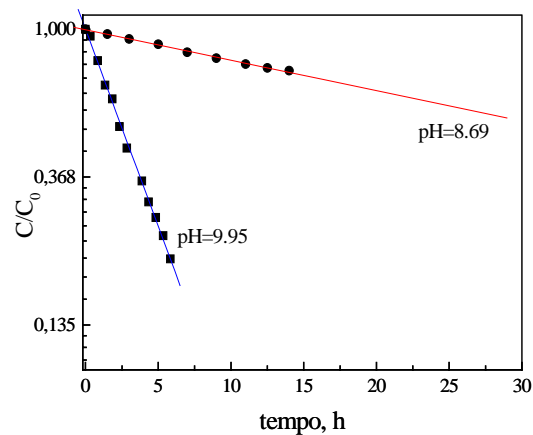


Figura 24. Degradação do ácido clavulânico em função do tempo em pHs 8,69 e 9,95 a 20°C e  $\mu=0,5\text{mol/L}$ .

A constante cinética de hidrólise ( $k$ ), para cada valor de pH, foi estimada pelo método clássico da regressão linear a 95% de grau de confiança, e estes valores são apresentados na Tabela 16, com os respectivos desvios padrão e tempos de meia vida ( $t_{1/2}$ ).

Tabela 16. Valores das constantes cinéticas e tempos de meia vida para a hidrólise do ácido clavulânico em soluções aquosas a diversos pHs, a 20°C e  $\mu=0,5$ .

pH	Constante de velocidade, $\text{h}^{-1}$	Tempo de meia vida, h
2,42	$0,26835 \pm 0,0185$	2,6
4,22	$0,00922 \pm 0,0002$	75,2
6,20	$0,00383 \pm 0,0001$	181,0
8,69	$0,02059 \pm 0,00046$	33,7
9,95	$0,26654 \pm 0,0041$	2,6

Verifica-se, assim, que a velocidade de hidrólise depende do pH do meio. Esse comportamento é típico de reações susceptíveis à catálise ácido-base específica, as quais obedecem a seguinte equação (Konecny et al., 1974):

$$k = k_a [H^+] + k_n + k_b [OH^-] \quad (\text{Eq. 4})$$

onde  $k_a$ ,  $k_n$  e  $k_b$  são as constantes parciais de hidrólise em meios ácidos, neutros e básicos, respectivamente.

Assim, com os valores experimentais das constantes globais ( $k$ ) e da concentração de íons  $H^+$  e  $OH^-$ , para cada valor de pH, determinou-se as constantes parciais de hidrólise do ácido clavulânico (Tabela 17). Essa estimativa foi feita através de regressão multilinear, pelo procedimento de Levenberg-Marquardt, a 95% de nível de confiança.

Tabela 17. Valores das constantes parciais de hidrólise do ácido clavulânico em solução aquosa, a 20°C e  $\mu=0,5\text{mol/L}$ .

Constante	Valor Estimado
$k_a, \text{L.mol}^{-1}.\text{h}^{-1}$	$69,0844 \pm 0,7343$
$k_n, \text{h}^{-1}$	$0,0057 \pm 0,0014$
$k_b, \text{L.mol}^{-1}.\text{h}^{-1}$	$2928,2164 \pm 31,5393$
$\chi^2 = 5,736 \times 10^{-6}$	
$R = 0,99985$	

Com os valores dessas constantes parciais pode-se escrever a equação cinética de primeira ordem, que representa o comportamento de degradação do ácido clavulânico, a 20°C e  $\mu=0,5 \text{ mol/L}$ :

$$k = 69,08[H^+] + 0,0057 + 2928,21[OH^-] \quad (\text{Eq. 5})$$

O ajuste desta equação aos dados experimentais, obtendo-se uma curva de  $\log k$  em função do pH, é ilustrado na Figura 25 onde nota-se que a faixa de pH de maior estabilidade do ácido clavulânico está situada entre 4,5 e 7,5 (Bersanetti et al., 2000).

Através da análise dos valores das constantes parciais obtidas, conclui-se que a velocidade de degradação do ácido clavulânico em soluções básicas é cerca de 40 vezes maior do que em meios ácidos. Essa maior susceptibilidade à hidrólise alcalina foi verificada também por Okamoto et al. (1996) que estudaram a hidrólise de cefdinir (uma cefalosporina semi-sintética oral) e por Konecny et al. (1973) em estudos com a

cefalosporina C. Estes últimos pesquisadores obtiveram valores de  $k_a$  e  $k_b$ , a 25°C, para a cefalosporina C, respectivamente, em torno de 250 e 6 vezes menores do que os obtidos no presente trabalho. Essa diferença está relacionada à estrutura química deste antibiótico que apresenta três pontos passíveis de sofrerem ataque hidrolítico (Figura 11), o que acaba tornando a quebra do anel  $\beta$ -lactâmico mais lenta.

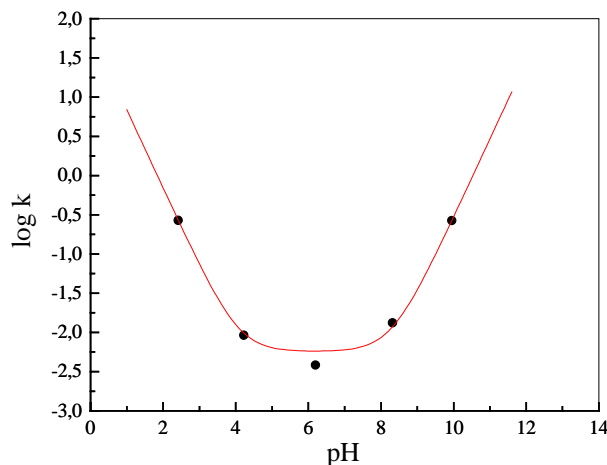


Figura 25. Constantes globais de hidrólise do ácido clavulânico em função do pH a 20°C e  $m=0,5$  mol/L.

Além disso, comparativamente ao ácido clavulânico, os autores constataram uma faixa mais ampla de pH (de 3 a 8), na qual a cefalosporina C apresenta uma maior estabilidade.

Investigou-se ainda a influência da força iônica na velocidade de hidrólise do ácido clavulânico. Os dados apresentados na Tabela 18 mostram que diminuições de  $\mu$  para valores iguais a 0,01 (pH=2) e 0,05 (pH=7) não acarretam variações nas velocidades de degradação deste composto. De acordo com Laidler (1950), a força iônica não interfere na velocidade das reações de hidrólise. Apesar disso, em muitos estudos de degradação de compostos  $\beta$ -lactâmicos a força iônica é mantida igual a 0,5.

Tabela 18. Valores das constantes globais de hidrólise do ácido clavulânico a 20°C para pHs em torno de 2,5 e 7, em valores de força iônica diferentes.

pH	Força iônica, mol/L	$k$ , $h^{-1}$
2,52	0,01	$0,28620 \pm 0,00011$
2,42	0,5	$0,26835 \pm 0,0185$
6,98	0,5	$0,00607 \pm 0,00012$
7,32	0,05	$0,00618 \pm 0,00021$

Um fator que influencia a velocidade de hidrólise é a concentração da solução tampão (Méndez et al., 1992). Constatou-se assim que a constante de velocidade aumenta com a concentração da solução tampão (Tabela 19). Esse fato deve estar relacionado ao aumento do número de íons acetato que podem funcionar como receptores de prótons durante a hidrólise, acelerando a velocidade de quebra do anel  $\beta$ -lactâmico.

Tabela 19. Valores das constantes de velocidade de hidrólise do ácido clavulânico a 20°C para soluções de mesmo pH e concentração de tampão diferente.

pH	Concentração da solução tampão, mol/L	k, h <sup>-1</sup>
4,16	0,1	0,0216 ± 0,00003
4,17	0,033	0,0096 ± 0,00001

É importante salientar que esses estudos antecederam a investigação da adsorção do ácido clavulânico em resinas e assim pôde-se trabalhar dentro da faixa de pH (4,5-7,5) na qual a degradação desse composto é baixa.

#### 5.4. Determinação da massa de resina adequada para a adsorção do AC

Para os estudos de adsorção em batelada torna-se necessário a determinação da concentração de resina necessária para se obter uma recuperação significativa do composto de interesse. Assim, variou-se a massa de resina IRA400, mantendo os demais parâmetros constantes (temperatura, pH, concentração inicial de ácido clavulânico e frequência de agitação).

Os valores da concentração de ácido clavulânico livre e da fração adsorvida em função da massa de resina são apresentados na Tabela 20.

Tabela 20. Valores das concentrações finais (C) e da fração adsorvida ( $C_{ads}/C_0$ ) de ácido clavulânico em função da concentração de IRA400 a 25°C, 200 rpm e  $C_0 = 157,64\text{mg/L}$ .

Concentração de resina g/L	Concentração de AC livre mg/L	Fração adsorvida
0,50	66,7	0,577
1,75	27,5	0,825
3,00	17,5	0,889
4,25	11,9	0,925
5,50	9,3	0,941

Verificou-se então que a fração de ácido clavulânico adsorvida aumentou exponencialmente com a concentração de resina (Figura 26).

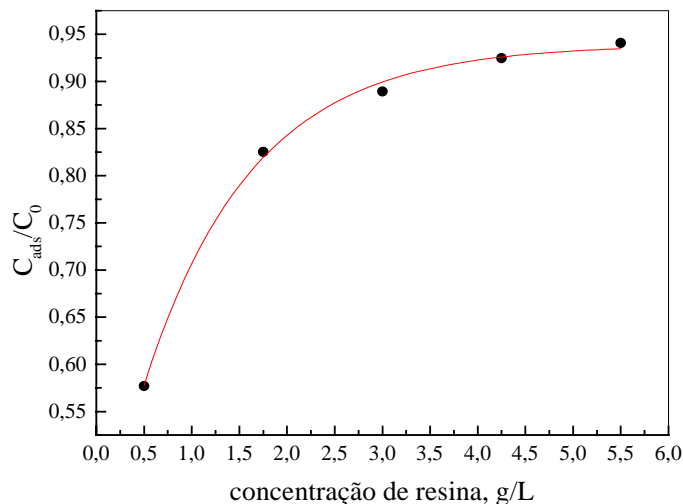


Figura 26. Variação da fração de ácido clavulânico adsorvida em função da concentração de resina IRA400 a 25°C, 200 rpm e  $C_0=157,64\text{mg/L}$ .

Pela Figura 26 pode-se notar que os dados experimentais seguiram um comportamento exponencial, representado pela seguinte equação:

$$\frac{C_{ads}}{C_0} = y_{res}^* + A_{res} \cdot e^{-(C_{res} - C_{0res})/B_{res}} \quad (\text{Eq. 6})$$

onde  $y_{res}^*$  corresponde à fração de ácido clavulânico adsorvida numa situação de equilíbrio,  $C_{0res}$  corresponde à concentração inicial de resina usada nesse experimento e  $A_{res}$  e  $B_{res}$  são parâmetros dessa equação exponencial.

Os valores dos parâmetros  $y_{res}^*$ ,  $A_{res}$ ,  $B_{res}$  e  $C_{0res}$  são apresentados na Tabela 21 juntamente com os valores de desvio padrão e de qui-quadrado.

Tabela 21. Valores dos parâmetros e respectivos desvios padrão do modelo exponencial ajustado aos dados de variação da fração adsorvida em função da concentração de resina a 25°C, 200 rpm e  $C_0=157,64\text{mg/L}$ .

Parâmetro	Valor	Desvio padrão
$y_{res}^*$	0,93906	0,00839
$C_{0res}$ , g/L	0,5	0
$A_{res}$	-0,36113	0,01204
$B_{res}$ , g/L	1,1333	0,10516
$\chi^2 = 0,00009$		

O comportamento exponencial verificado pode ser atribuído ao aumento do número de sítios de adsorção livres, com os quais as moléculas de ácido clavulânico podem interagir. Ao se atingir uma certa concentração de adsorvente, quase todas as moléculas já se apresentam ligadas à superfície da resina. Assim, posteriores aumentos na concentração de adsorvente não produzem um ganho significativo no rendimento de adsorção.

Nota-se que em torno de 3,75 g/L de resina a variação de fração adsorvida começa tender a um valor limite e diminuindo-se  $C_0$  pela metade garante-se a saturação da resina.

O mesmo tipo de estudo foi realizado com a resina XAD761 e os resultados obtidos (Tabela 22) mostraram que este adsorvente não é adequado para a retenção de ácido clavulânico nas condições experimentais em questão. Desta forma, em estudos posteriores com essa resina neutra deve-se utilizar concentrações bem elevadas desse adsorvente.

Tabela 22. Valores das concentrações finais (C) e da fração adsorvida ( $C_{ads}/C_0$ ) de ácido clavulânico em função da concentração de XAD761 a 25°C, 200 rpm e  $C_0=188,98$  mg/L.

<b>Concentração de resina g/L</b>	<b>Concentração de AC livre mg/L</b>	<b>Fração adsorvida</b>
0,50	188,9	0,0002
1,75	168,5	0,1086
3,00	198,9	-0,0522
4,25	200,4	-0,0606
5,50	188,7	0,0014
9,00	194,6	-0,0296
12,50	186,7	0,0121

### 5.5. Investigação da cinética de adsorção do ácido clavulânico em resinas

Nos experimentos cinéticos de adsorção foram utilizadas resinas neutras (XAD4 e XAD761) e de troca-iônica (IRA400).

A resina IRA400, contendo grupos amônio quaternário (carregados positivamente) foi escolhida com base em estudos de adsorção de ácido clavulânico realizados por Mayer et al. (1996). Assim, foram realizados experimentos cinéticos de adsorção empregando-se uma concentração de resina ( $C_{res}$ ) de 3,75 g/L (escolhido de acordo com a curva de massa de resina em função da massa de resina). Em um deles empregou-se uma agitação branda e no outro não se utilizou agitação. Os dados obtidos (Tabela 23 e Figura 27) mostram que sem agitação, aproximadamente 75% do ácido clavulânico é adsorvido após 6,5 h,

enquanto com agitação a adsorção foi cerca de 50% da concentração inicial em apenas 10 minutos. A evidência de significativas limitações quanto à transferência externa de massa na ausência de agitação descartou esta condição. Desta forma, os demais experimentos foram conduzidos sob agitação moderada.

Tabela 23. Valores da concentração livre e da fração de ácido clavulânico adsorvida em função do tempo em 3,75g/L de IRA400, com agitação e sem agitação, a 26°C.

Tempo, min		Concentração AC livre, mg/L		Fração adsorvida	
Sem agitação	Com agitação	Sem agitação	Com agitação	Sem agitação	Com agitação
0	0	72,3	71,3	0	0
10	10	65,7	34,2	0,090	0,520
20	20	59,8	21,1	0,172	0,705
33	32	56,1	15,8	0,224	0,779
43	45	53,1	13,1	0,265	0,816
68	60	45,9	11,6	0,364	0,837
88	90	41,9	10,2	0,420	0,857
110	154	35,3	7,6	0,512	0,893
130	250	32,5	4,2	0,551	0,941
155	343	31,0	4,0	0,571	0,944
219	390	26,4	9,5	0,635	0,867
279		24,6		0,660	
339		21,0		0,710	
399		17,5		0,759	

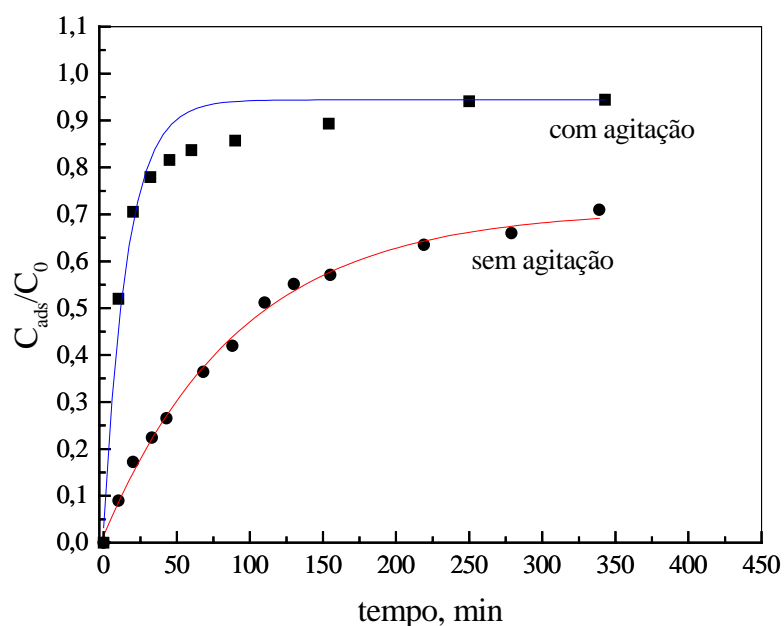


Figura 27. Variação da fração de ácido clavulânico em função do tempo para 3,75g/L de IRA400 a 25°C: sem agitação e com agitação.

Em seguida, verificou-se a influência da temperatura na cinética de adsorção em IRA400. Os valores de concentração livre e da fração adsorvida de ácido clavulânico, obtidos experimentalmente, são mostrados na Tabela 24.

Tabela 24. Valores da concentração livre e da fração de ácido clavulânico adsorvida em função do tempo em 3,75g/L de IRA400 e pH=6,5 a 22, 26 e 30°C.

Tempo min	Concentração de AC livre, mg/L			Fração adsorvida		
	22°C	26°C	30°C	22°C	26°C	30°C
0	66,9	78,8	69,3	0	0	0
2	57,6	59,6	56,2	0,139	0,243	0,189
4	49,3	52,0	47,3	0,263	0,341	0,317
6	43,7	45,1	40,1	0,347	0,427	0,420
8	37,6	38,9	34,4	0,438	0,506	0,503
10	33,0	34,2	29,7	0,507	0,565	0,571
12	29,2	30,2	25,7	0,564	0,617	0,628
15	24,6	25,0	21,2	0,632	0,683	0,694
20	19,0	18,7	16,0	0,716	0,763	0,769
25	15,8	17,3	12,9	0,764	0,780	0,814
30	12,9	13,5	11,0	0,807	0,828	0,841
45	9,7	10,1	9,2	0,855	0,872	0,868
60	8,7	9,1	8,3	0,869	0,885	0,880

Pela análise dos dados obtidos (Figura 28) pode-se notar que o fenômeno de adsorção do ácido clavulânico na resina de troca-iônica em questão não é influenciado significativamente pela temperatura, na faixa estudada.

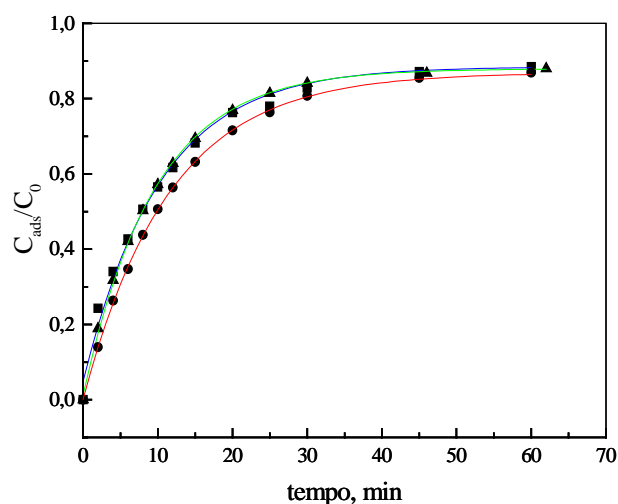


Figura 28. Variação da fração de ácido clavulânico adsorvida em função do tempo devido à adsorção em 3,75g/L de IRA400 e pH=6,5 em três temperaturas diferentes: (—)22°C, (—)26°C e (—)30°C.



O seguinte modelo exponencial ajustou-se muito bem aos dados experimentais nas três temperaturas estudadas:

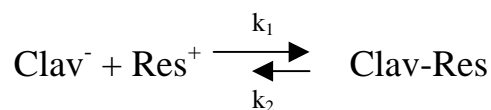
$$\frac{C_{\text{ads}}}{C_0} = y_{\text{ads}}^* + A_{\text{ads}} \cdot e^{-t/B_{\text{ads}}} \quad (\text{Eq. 7})$$

Os valores das constantes  $y_{\text{ads}}^*$ ,  $A_{\text{ads}}$  e  $B_{\text{ads}}$  são mostrados na Tabela 25, juntamente com os valores de desvio padrão.

Tabela 25. Valores dos parâmetros do modelo exponencial ajustado aos dados cinéticos de adsorção do ácido clavulânico a 22, 26 e 30°C e  $C_0=70\text{mg/L}$ .

Parâmetros	22°C	26°C	30°C
$y_{\text{ads}}^*$	$0,86919 \pm 0$	$0,88503 \pm 0$	$0,87967 \pm 0$
$A_{\text{ads}}$	$-0,86739 \pm 0,00312$	$-0,83601 \pm 0,01862$	$-0,86634 \pm 0,00521$
$B_{\text{ads}}, \text{min}$	$11,52113 \pm 0,07893$	$10,25799 \pm 0,42494$	$9,58594 \pm 0,10587$
$\chi^2$	0,00002	0,00059	0,00004

Considerando-se o processo de adsorção como um fenômeno reversível limitado pela cinética e, em analogia à técnica de determinação de parâmetros cinéticos baseada em reações de relaxação, tem-se:



onde:  $\text{Clav}^-$  corresponde ao ácido clavulânico,  $\text{Res}^+$  à resina e  $\text{Clav-Res}$  ao complexo formado pela adsorção do inibidor na superfície do adsorvente.

Uma vez que, os experimentos foram realizados em condições diluídas, a concentração de resina permanece praticamente constante durante os experimentos, podendo-se então definir uma constante de velocidade de adsorção aparente  $k'_1$  de tal forma que:

$$k'_1 = k_1 \cdot C_{\text{res}} \quad (\text{Eq. 8})$$

Assim:

$$\frac{dC_{\text{ads}}}{dt} = k'_1 (C_0 - C_{\text{ads}}) - k_2 C_{\text{ads}} \quad (\text{Eq. 9})$$

Integrando-se:

$$\frac{C_{\text{ads}}}{C_0} = \frac{k_1'}{k_1' + k_2} - \frac{k_1'}{k_1' + k_2} e^{-(k_1' + k_2)t} \quad (\text{Eq. 10})$$

Comparando-se a Equação 10 com o modelo exponencial ajustado, pode-se afirmar que o parâmetro  $B_{\text{ads}}$  corresponde a  $(k_1' + k_2)$  e os parâmetros  $A_{\text{ads}}$  e  $y_{\text{ads}}^*$  correspondem a  $k_1'/(k_1' + k_2)$ .

Assim, a partir dos parâmetros A e B chega-se ao valor da constante de equilíbrio de adsorção do ácido clavulânico em IRA400 ( $K_{\text{ads}}$ ) e também das constantes de velocidade de adsorção ( $k_1'$ ) e de dessorção ( $k_2$ ). Os valores aparecem mostrados na Tabela 26.

Tabela 26. Valores das constantes de adsorção ( $k_1'$ ), dessorção ( $k_2$ ) e de equilíbrio ( $K_{\text{ads}}$ ) para a adsorção do ácido clavulânico em 3,75 g/L de IRA400 com  $C_0=70\text{mg/L}$  a 22, 26 e 30°C.

Constante	22°C	26°C	30°C
$k_1', \text{h}^{-1}$	4,518	4,890	5,424
$k_2, \text{h}^{-1}$	0,690	0,960	0,834
$K_{\text{ads}}$	6,5478	5,0938	6,5036

Nos estudos com a resina XAD4, os dados experimentais (Tabela 27) mostram que não ocorre uma adsorção significativa (Figura 29). Essa resina neutra é um polímero de poliestireno-divinilbenzeno e, sendo assim, apresenta vários anéis aromáticos que podem interagir com o ácido clavulânico, através de forças dipolo-dipolo induzido. Como a energia desse tipo de interação é baixa, quando comparada àquela liberada em ligações eletrostáticas, a fração máxima adsorvida está em torno de 6 %.

Tabela 27. Valores de concentração de ácido clavulânico livre e da fração adsorvida em função do tempo para 62,5g/L de XAD4 a 26°C.

Tempo min	Concentração ácido clavulânico mg/L	Fração adsorvida $C_{\text{ads}}/C_0$
0	897,8	0
2	872,6	0,028
3	888,9	0,010
5	859,3	0,043
10	856,3	0,046
15	847,4	0,056
20	844,5	0,059
40	840,0	0,064
60	847,4	0,056
120	862,2	0,039

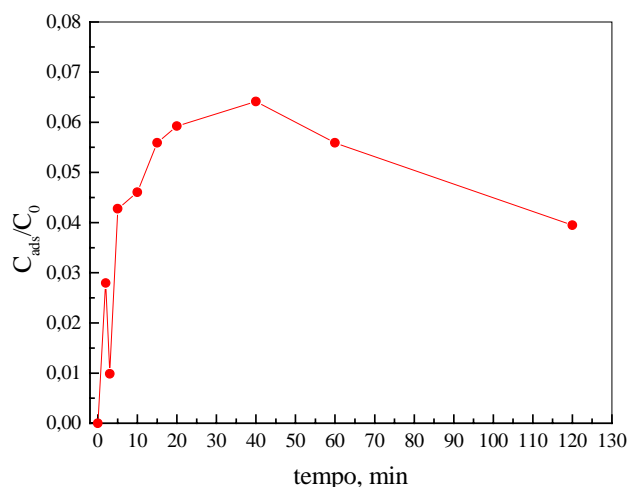


Figura 29. Variação da fração de ácido clavulânico adsorvida com o tempo em 62,5 g/L de XAD4, a pH 6,5 e 26°C.

De acordo com Mayer et al. (1996), uma adsorção significativa do ácido clavulânico é conseguida com um sistema íon-par da resina XAD4 com sais de amônio quaternário. Como esses compostos são tóxicos, resolveu-se utilizar aminoácidos como contra-íons.

Inicialmente, empregou-se a fenilalanina, que por possuir um anel aromático, apresenta uma grande semelhança estrutural com a resina XAD4 o que facilita a adsorção. Após o equilíbrio da resina com uma solução de fenilalanina, a concentração adsorvida desse aminoácido foi igual a 0,00226 mol/L. Assim, a adsorção do ácido clavulânico no sistema XAD4/fenilalanina foi acompanhada em função do tempo a 26°C. Os resultados obtidos (Tabela 28 e Figura 30) mostram que esse sistema também não é adequado para a recuperação deste composto  $\beta$ -lactâmico. Esse fato deve estar relacionado à proximidade entre os grupos carboxílicos do ácido clavulânico e do aminoácido em questão.

Tabela 28. Valores da concentração de ácido clavulânico livre e da fração adsorvida em função tempo para o sistema íon-par XAD4-Phe ( $C_{res}=62,5$  g/L) a 26°C.

Tempo min	Concentração ácido clavulânico mg/L	Fração adsorvida $C_{ads}/C_0$
0	1032,0	0
2,5	962,5	0,067
5	971,6	0,059
7,5	989,6	0,041
10	1019,2	0,012
15	1033,3	-0,001
20	960,0	0,070
30	963,8	0,066

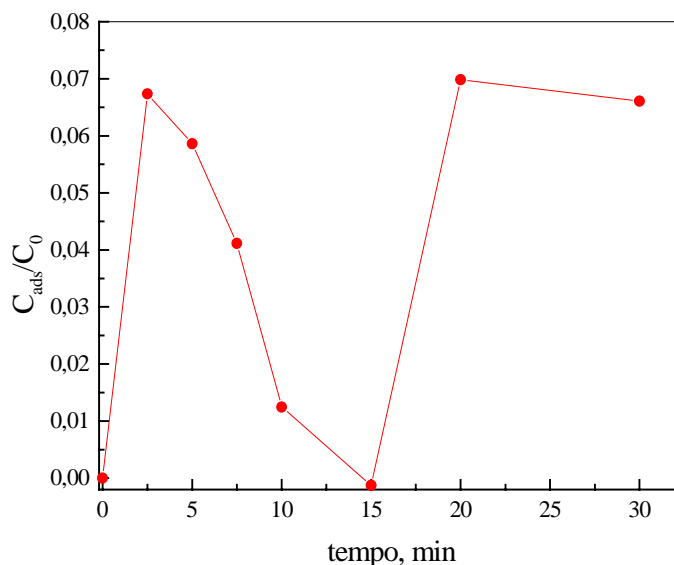


Figura 31. Variação da fração de ácido clavulânico adsorvida com o tempo em 62,5 g/L de XAD4-Phe a 26°C

Para se eliminar o efeito de repulsão entre esses dois compostos, deve-se trabalhar em regiões de pH abaixo do  $pK_a$  do aminoácido, onde o grupo carboxílico apresenta-se protonado e conseqüentemente não repele a molécula de ácido clavulânico. Entretanto, em regiões ácidas ( $pH < 4,5$ ), o ácido clavulânico apresenta taxas de decomposição hidrolítica elevadas.

Os aminoácidos lisina e arginina, que possuem grupamentos positivos em suas cadeias laterais, também foram investigados como possíveis contra-íons. No entanto, esses compostos não são adsorvidos pela resina XAD4 e, portanto, não podem ser utilizados como para a recuperação do ácido clavulânico presente em meio aquoso (Tabela 29).

Tabela 29. Concentrações de Lys e Arg após 40h em equilíbrio com 50 g/L de resina XAD4 a 25°C.

<b>Aminoácido</b>	<b>Concentração inicial mol/L</b>	<b>Concentração final mol/L</b>
Lys	0,010	0,010
Arg	0,011	0,012

A eficiência da resina XAD761 para a recuperação do ácido clavulânico também foi investigada. Pelos dados experimentais obtidos (Tabela 30) verifica-se uma adsorção significativa nos dois primeiros minutos mas, em seguida, a concentração de ácido clavulânico em solução aumenta novamente. Após 45 minutos de análise apenas 5%

( $C_{ads}/C_0$ ) do composto foi retido pela resina (Figura 31). Essa adsorção significativa logo no início pode ser explicada pela difusão das moléculas de ácido clavulânico para a superfície da resina, mas com o passar do tempo as interações das moléculas de água com o adsorvente e com as moléculas do composto  $\beta$ -lactâmico acabaram superando as energias de adsorção.

Tabela 30. Valores de concentração de ácido clavulânico livre e fração adsorvida em função do tempo para 62,5g/L de XAD761 a 26°C.

Tempo min	Concentração de AC livre mg/L	Fração adsorvida $C_{ads}/C_0$
0	1040,4	0
2,5	795,6	0,235
5	963,8	0,074
10	992,3	0,046
20	984,8	0,053
45	983,3	0,055

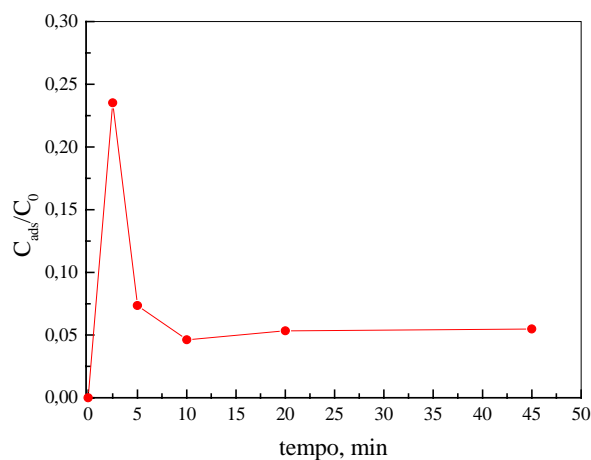


Figura 31. Variação da fração de ácido clavulânico adsorvida com o tempo em 62,5 g/L de XAD761 a 26°C.

Para melhorar a adsorção nas resinas XAD tentou-se diminuir o pH da solução, dentro dos limites de estabilidade do ácido clavulânico, a fim de deslocar seu equilíbrio de ionização para a forma molecular e aumentar, com isso, o rendimento de adsorção. Observou-se que, a eficiência de recuperação foi desprezível com a resina XAD761. Por sua vez, verificou-se que a adsorção em XAD4 foi crescente, porém, a pequena fração adsorvida não justificou uma continuidade dos testes com esta resina (Tabela 31 e Figura 32).

Tabela 31. Valores de concentração de ácido clavulânico livre e fração adsorvida em função do tempo para 62,5g/L de XAD4 e XAD761 a 26°C e pH=4,5.

Tempo min	Concentração de AC livre, mg/L		Fração adsorvida	
	XAD4	XAD761	XAD4	XAD761
0	894,8	853,3	0	0
2,5	816,3	825,2	0,088	0,033
5	837,1	835,6	0,064	0,045
10	840,0	810,4	0,061	0,050
15	835,6	811,9	0,066	0,049
20	807,4	817,8	0,098	0,042
30	819,3	825,2	0,084	0,033
40	767,5	822,2	0,142	0,036

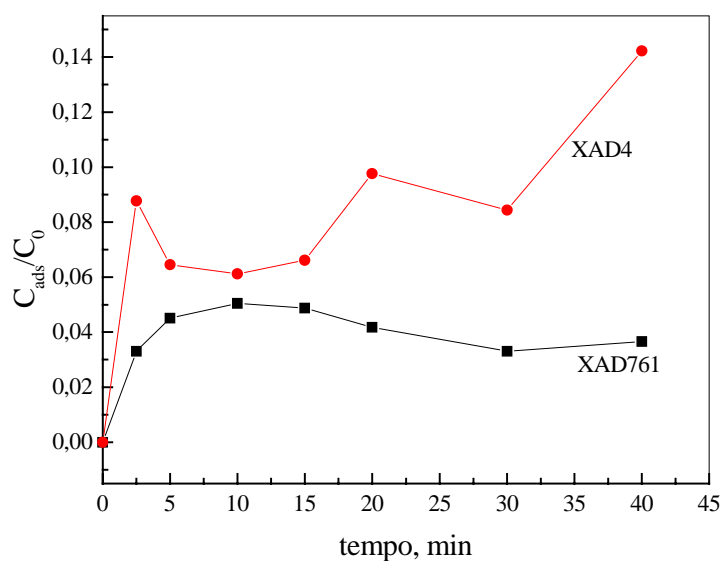


Figura 32. Variação da fração de ácido clavulânico adsorvida em função do tempo para as resinas XAD4 e XAD761 ( $C_{res}=62,5$  g/L) a 26°C e pH=4,5.

### 5.6. Experimentos de dessorção em IRA400

A eficiência de um processo de recuperação de um composto, a partir de qualquer extrato bruto, deve-se também à facilidade da molécula adsorvida em retornar ao meio líquido, no momento da eluição ou dessorção. Desta forma, investigou-se a cinética de dessorção do ácido clavulânico da resina IRA400, empregando-se solução de NaCl 5% e 10% (p/v). Os valores experimentais da concentração e da fração de ácido clavulânico dessorvido são mostrados nas Tabelas 32 e 33.

Verificou-se que com o aumento da concentração de íons  $\text{Cl}^-$  no eluente, a fração de ácido clavulânico recuperada a partir da resina foi em torno de 10% mais elevada após 100 minutos (Figura 33).

Tabela 32. Valores das concentrações e frações desorvidas com solução de NaCl 5% a 26°C, a partir de 3,75 g/L da resina IRA400 contendo 60,62 mg/L de ácido clavulânico adsorvido.

<b>Tempo min</b>	<b>Concentração desorvida mg/L</b>	<b>Fração desorvida <math>C_{des}/C_{ads}</math></b>
4	21,3	0,351
6	24,8	0,409
8	27,4	0,452
10	29,1	0,479
15	33,8	0,558
20	36,7	0,606
30	42,6	0,703
40	45,3	0,748
50	48,2	0,796
70	51,9	0,855

Tabela 33. Valores das concentrações e frações desorvidas com solução de NaCl 10% a 26°C, a partir de 3,75 g/L da resina IRA400 contendo 51,50 mg/L de ácido clavulânico adsorvido.

<b>Tempo min</b>	<b>Concentração desorvida mg/L</b>	<b>Fração desorvida <math>C_{desorv}/C_{ads}</math></b>
0	8,5	0,166
2	15,0	0,291
4	18,4	0,357
6	21,3	0,413
8	23,6	0,458
10,5	25,6	0,498
15	28,6	0,556
20	31,4	0,611
25,5	33,9	0,659
30	36,1	0,701
40	39,7	0,771
50	42,8	0,832

O seguinte modelo exponencial ajustou-se muito bem aos dados experimentais:

$$\frac{C_{desorv}}{C_0} = y_{desor}^* + A_{desor} \cdot e^{-t/B_{desor}} \quad (\text{Eq.11})$$

Os valores das constantes  $y_{desor}^*$ ,  $A_{desor}$  e  $B_{desor}$  são mostrados na Tabela 34 juntamente com o valor do desvio padrão.

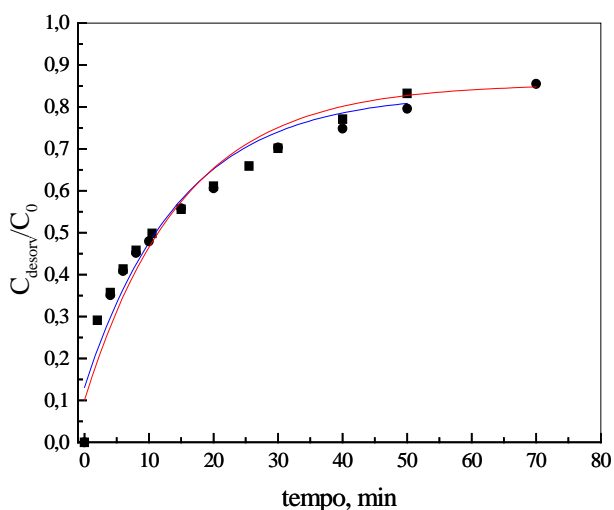


Figura 34. Dessorção do AC da resina IRA400 em função do tempo com NaCl: (—)5% e(—)10%, a 28°C.

Tabela 34. Valores dos parâmetros do modelo exponencial ajustado aos dados cinéticos de desorção do ácido clavulânico a 28°C com solução de NaCl 5% e 10% (p/v).

Parâmetros	NaCl 5%	NaCl 10%
$y_{\text{desor}}^*$	0,855	0,832
$A_{\text{desor}}$	$-0,75418 \pm 0,04672$	$-0,7012 \pm 0,04171$
$B_{\text{desor}}, \text{ min}$	$15,15663 \pm 1,89241$	$14,73245 \pm 1,84064$
$\chi^2$	0,00336	0,00361

Os parâmetros  $y_{\text{desor}}^*$  e  $A_{\text{desor}}$  correspondem ambos a  $k_3/(k_3+k_4)$ , mas no entanto, seus valores não foram iguais. Essa diferença pode ser atribuída ao aumento da concentração de resina à medida que as alíquotas de 0,5 mL eram retiradas nos diversos intervalos de tempo. No final houve uma diminuição de volume igual a 5 mL e levando-se em consideração este valor pode-se calcular o valor da fração de equilíbrio corrigida  $(y_{\text{desor}}^*)_{\text{corr}}$ .

Assim para a desorção com NaCl 5%:

$$y_{\text{desor}}^* \cdot V_1 = (y_{\text{desor}}^*)_{\text{corr}} \cdot V_2 \Rightarrow (y_{\text{desor}}^*)_{\text{corr}} = \frac{0,855 \cdot 35\text{mL}}{40\text{mL}} = 0,7481$$

Para a desorção com NaCl 10% o valor de  $(y_{\text{desor}}^*)_{\text{corr}}$  é igual a 0,728.

Da mesma forma que para a adsorção, pode-se calcular as constantes cinéticas de desorção ( $k_3$ ) e de adsorção ( $k_4$ ), a partir dos parâmetros mostrados. Os resultados são apresentados na Tabela 35.



Tabela 35. Valores das constantes de adsorção ( $k_4$ ), dessorção ( $k_3$ ) e de equilíbrio ( $K_{des}$ ) para a dessorção do ácido clavulânico de 3,75 g/L de IRA400, empregando-se NaCl 5 e 10%.

Constante	NaCl 5%	NaCl 10%
$k_3, h^{-1}$	2,986	2,855
$k_4, h^{-1}$	0,973	1,216
$K_{des}$	3,0688	2,3479

A dessorção pode também ser efetuada empregando solução de NaOH. No entanto, por se tratar de uma base forte, o pH da solução ficará em torno de 12-13 e à medida que as moléculas de ácido clavulânico forem sendo liberadas para o meio líquido, sofrerão rapidamente hidrólise catalisada pelos íons  $OH^-$  e assim a recuperação desse composto não será satisfatória.

### 5.7. Influência do pH na adsorção do ácido clavulânico em IRA400

Os valores de concentração de ácido clavulânico livre e da fração adsorvida em IRA400 nos diversos valores de pH são mostrados na Tabela 36.

Tabela 36. Valores das concentrações iniciais ( $C_0$ ), finais ( $C$ ) e da fração adsorvida ( $C_{ads}/C_0$ ) de ácido clavulânico em IRA400 em diversos valores de pH, a 25°C e 200 rpm.

pH	Concentração inicial mg/L	Concentração final mg/L	Fração adsorvida
4,43	59,9	49,8	0,169
4,89	59,8	51,4	0,140
5,24	59,8	53,4	0,107
5,72	60,0	50,9	0,152
6,13	57,6	46,0	0,202
6,45	62,6	48,0	0,233
7,00	62,9	44,0	0,301

A adsorção do ácido clavulânico em resinas de troca-iônica é influenciada por variações no pH do meio, uma vez que, o grau de retenção dependerá da proporção entre a forma iônica e a forma molecular desse composto. Com um aumento do pH, o equilíbrio de ionização do ácido desloca-se no sentido da formação do íon clavulanato que é facilmente adsorvido pela resina IRA400. Assim, era esperado um aumento constante da massa adsorvida em função do pH. No entanto, verificou-se que a curva de adsorção do ácido clavulânico em função do pH (Figura 34) apresenta a forma de um V, com um mínimo em

pH igual a 5,2. A diminuição da massa adsorvida em valores de pH menor que 5,2 deve estar relacionada ao processo de dessorção dos íons  $\text{Cl}^-$  e porventura dos íons citrato e fosfato que é mais favorecido em regiões ácidas.

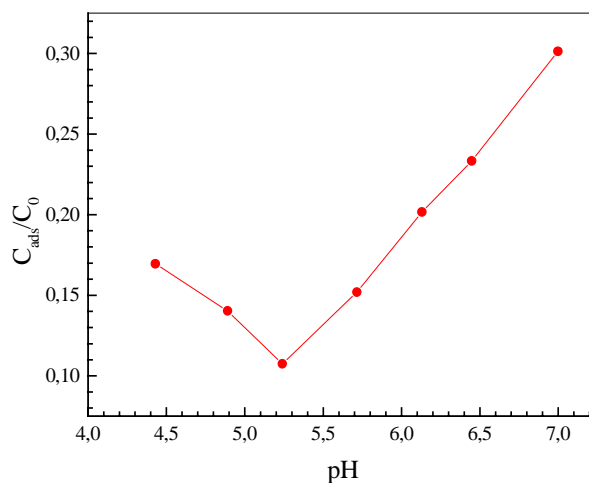


Figura 34. Influência do pH na fração de ácido clavulânico adsorvida por 3,75g/L de IRA400 a 25°C, 200rpm e  $C_0=70\text{mg/L}$ .

### 5.8. Influência da força iônica na adsorção do ácido clavulânico em IRA400

De acordo com Baustista et al. (1999) os íons presentes na fase móvel, especialmente o cloreto, competem com o composto de interesse pelos grupos carregados da fase estacionária.

Desta forma, torna-se interessante analisar até que ponto as variações da força iônica influenciam a retenção do ácido clavulânico em IRA400. Na Tabela 37 são mostrados os valores da fração de ácido clavulânico adsorvida em IRA400 em função da força iônica da solução.

Tabela 37. Valores das concentrações iniciais ( $C_0$ ), finais ( $C$ ) e da fração adsorvida ( $C_{\text{ads}}/C_0$ ) de ácido clavulânico em IRA400 em diversos valores de força iônica, a 25°C e 200 rpm.

Força iônica	Concentração inicial mg/L	Concentração final mg/L	Fração adsorvida
0,023	66,4	33,3	0,498
0,033	64,7	46,5	0,282
0,043	65,7	50,0	0,240
0,053	66,9	53,8	0,195
0,063	66,8	54,8	0,180
0,073	67,1	57,6	0,142
0,083	67,2	58,3	0,133

Os resultados experimentais (Figura 35) mostraram que a fração adsorvida sofre grande influência da concentração das espécies iônicas presentes em solução. Em regiões com maior força iônica, a variação da fração adsorvida diminui mais suavemente.

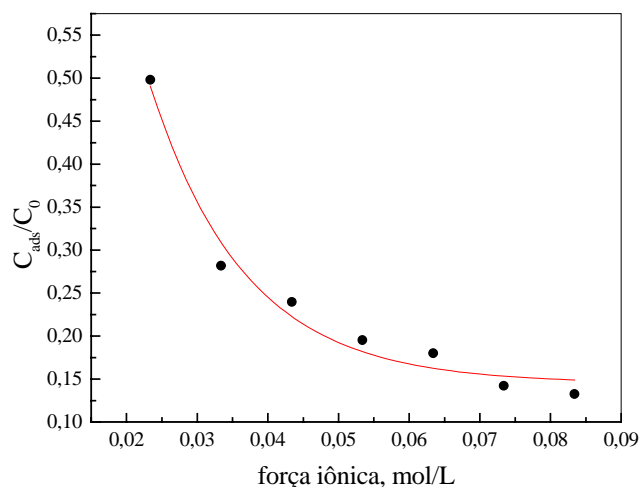


Figura 35. Influência da força iônica na fração de ácido clavulânico adsorvida por 3,75g/L de IRA400 a 25°C, 200rpm e  $C_0=70\text{mg/L}$ .

Os dados experimentais da variação da fração de ácido clavulânico seguiram um comportamento exponencial, representado pela seguinte equação:

$$\frac{C_{ads}}{C_0} = y_{\mu}^* + A_{\mu} \cdot e^{-(\mu - \mu_0)/B_{\mu}} \quad (\text{Eq. 12})$$

onde  $y_{\mu}^*$  corresponde à fração adsorvida no equilíbrio,  $\mu_0$  corresponde à força iônica inicial utilizada nesse estudo e  $A_{\mu}$  e  $B_{\mu}$  são parâmetros empíricos.

Os valores dos parâmetros  $y_{\mu}^*$ ,  $A_{\mu}$ ,  $B_{\mu}$  e  $\mu_0$  aparecem mostrados na Tabela 38 juntamente com os valores de desvio padrão e de qui-quadrado.

Tabela 38. Valores dos parâmetros e respectivos desvios padrão do modelo exponencial ajustado aos dados de variação da fração adsorvida em função da força iônica a 25°C, 200 rpm e  $C_0=70\text{mg/L}$ .

Parâmetro	Valor	Desvio padrão
$y_{\mu}^*$	0,14508	0,01656
$\mu_0$ , mol/L	0,02338	0
$A_{\mu}$	0,34576	0,02536
$B_{\mu}$ , mol/L	0,0134	0,00255
$\chi^2 = 0,00049$		

Pode-se notar claramente que a força iônica tem uma grande influência no rendimento de recuperação do ácido clavulânico em IRA400. Assim, para se aumentar a eficiência do processo de troca-iônica deve-se trabalhar em regiões de força iônica baixa. Como o valor desse parâmetro para um meio fermentativo sintético, que tem sido normalmente utilizado em nossos laboratórios para a produção de ácido clavulânico, encontra-se em torno de 0,09 (Tabela 39) pode-se tentar aumentar a eficiência da adsorção aumentando-se a concentração de resina.

Tabela 39. Concentrações dos íons presentes no meio fermentativo sintético utilizado em nossos laboratórios, para a produção de ácido clavulânico, e cálculo da força iônica total.

Íon	Concentração (C <sub>i</sub> ) mol/L	Carga (z)	C <sub>i</sub> .z <sup>2</sup>
Ca	0,00136	2	0,00544
Cl	0,00272	1	0,00272
Na	0,01711	1	0,01711
Cl	0,01711	1	0,01711
Mg	0,004057	2	0,016228
SO <sub>4</sub>	0,004057	2	0,016228
K	0,00878	1	0,00878
HPO <sub>4</sub>	0,00439	2	0,01756
K	0,00907	1	0,00907
H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,00907	1	0,00907
NH <sub>4</sub>	0,02497	1	0,02497
Ac	0,02497	1	0,02497
Asparagina	0,005495	1	0,005495
Mn	5,05. 10 <sup>-6</sup>	2	2,02. 10 <sup>-5</sup>
Cl	1,01. 10 <sup>-5</sup>	1	1,01. 10 <sup>-5</sup>
Fe	3,6. 10 <sup>-6</sup>	2	1,439. 10 <sup>-5</sup>
SO <sub>4</sub>	3,6. 10 <sup>-6</sup>	2	1,439. 10 <sup>-5</sup>
Zn	3,48. 10 <sup>-6</sup>	2	1,392. 10 <sup>-5</sup>
SO <sub>4</sub>	3,48. 10 <sup>-6</sup>	2	1,392. 10 <sup>-5</sup>
<b><math>\mu = 0,5 \Sigma c.z^2 =</math></b>			<b>0,087419</b>

Sendo assim, realizou-se um experimento para se determinar a massa de resina necessária para a retenção significativa do ácido clavulânico em força iônica igual a 0,09. Com os dados obtidos (Tabela 40) pode-se notar um aumento linear da fração adsorvida em função da massa de resina (Figura 36). Se a faixa de massa de resina estudada fosse maior, a forma da curva obtida seria exponencial, assim como foi verificado no item 4.4.

Tabela 40. Valores das concentrações finais ( $C$ ) e da fração adsorvida ( $C_{ads}/C_0$ ) de ácido clavulânico em função da concentração de IRA400 em solução de força iônica igual a 0,09; a 25°C, 200 rpm e  $C_0=70,67\text{mg/L}$ .

Concentração de resina g/L	Concentração final de AC mg/L	Fração adsorvida
5,0	64,8	0,083
7,5	63,4	0,103
10,0	60,6	0,142
12,5	59,1	0,163
15,0	57,2	0,191
17,5	55,1	0,221

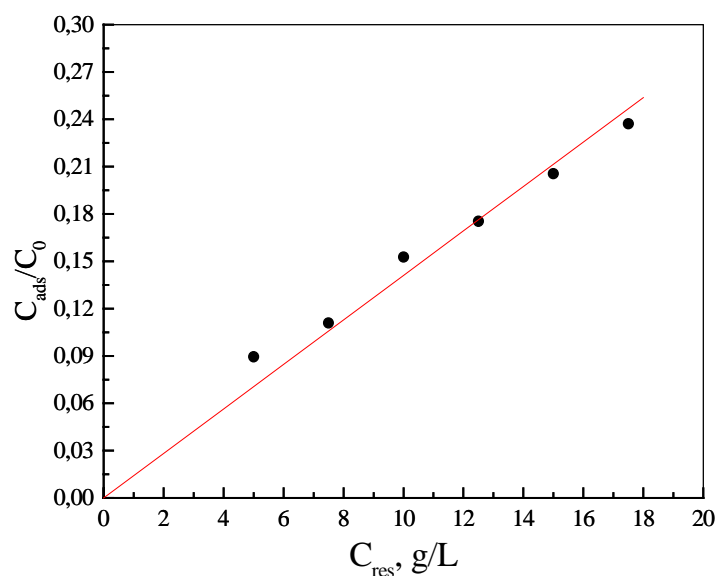


Figura 36. Variação da fração de ácido clavulânico adsorvida em função da concentração de IRA400 para solução aquosa de força iônica igual a 0,09 a 25°C, 200 rpm e  $C_0=70\text{mg/L}$ .

A seguinte equação de reta, com coeficiente de correlação igual a 0,9789, ajustou-se aos dados experimentais:

$$\frac{C_{ads}}{C_0} = 0,0141.C_{res} \quad (\text{Eq. 13})$$

onde:  $C_{ads}/C_0$  corresponde a fração de ácido clavulânico adsorvida e  $C_{res}$  corresponde a concentração de resina presente em solução.

A partir dos dados experimentais pode-se também estimar a proporção entre massa de resina e massa de ácido clavulânico a ser recuperada em soluções aquosas com  $\mu=0,09$  mol/L. A equação abaixo mostra essa relação:

$$m_{res} = 474.m_{ac} \quad (\text{Eq. 14})$$

Desta forma, para a recuperação de 1 g de ácido clavulânico presente num meio com força iônica de 0,09 são necessários 474 g da resina IRA400. Para soluções aquosas contendo somente ácido clavulânico ( $\mu < 0,01$  mol/L), esta proporção era de 53,6 o que foi determinado nos estudos da determinação da massa de IRA400 adequada para a adsorção do ácido clavulânico (item 5.4).

### 5.9. Influência da concentração inicial de ácido clavulânico na adsorção em IRA 400

Para se verificar a influência da concentração inicial de AC na velocidade de adsorção, realizou-se experimentos com  $C_0$  iguais a 200, 380, 690 e 1000 mg/L e mantendo-se a proporção  $C_{res}/C_0$  igual a 53, 6.

Os gráficos da fração de ácido clavulânico adsorvida em função do tempo para os cinco valores de concentrações iniciais (Figura 37) mostram que a velocidade de adsorção é maior para soluções mais concentradas, enquanto a fração máxima adsorvida está em torno de 90% para todos os valores de concentrações estudadas. Esse aumento da velocidade de adsorção está relacionado ao maior gradiente de concentração entre a solução e a superfície da resina, o que favorece a difusão das moléculas de adsorvato.

Os valores das constantes cinéticas e de equilíbrio estimadas a partir dos dados experimentais são apresentados na Tabela 41.

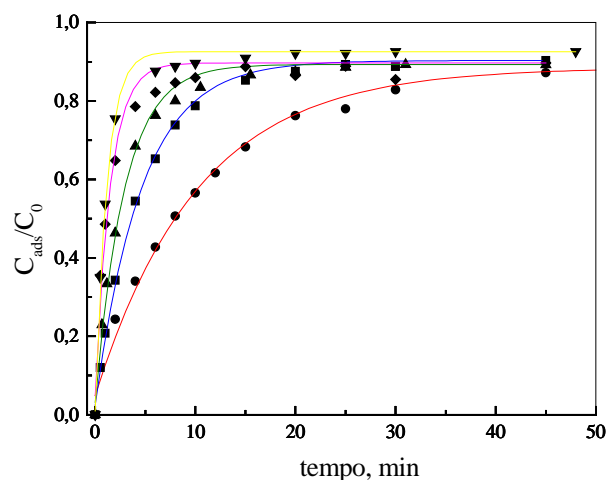


Figura 37. Fração adsorvida em função do tempo para diferentes concentrações iniciais de ácido clavulânico a 26°C e  $C_{res}/C_0=53,57$ : (—)  $C_0=78$ mg/L, (—)  $C_0=183$ mg/L, (—)  $C_0=450$ mg/L, (—)  $C_0=830$ mg/L, (—)  $C_0=940$ mg/L.

Tabela 41. Valores das constantes cinéticas de adsorção ( $k_1$ ), de dessorção ( $k_2$ ) e da constante de equilíbrio ( $K_{ads}$ ) para diferentes concentrações iniciais de ácido clavulânico a 26°C e  $C_{res}/C_0 = 53,57$ .

Concentração inicial, mg/L	$k_1, h^{-1}$	$k_2, h^{-1}$	$K_{ads}$
78	4,890	0,960	5,094
183	11,312	1,562	7,242
450	17,616	2,832	6,220
830	33,809	6,070	5,570
940	47,55	4,350	10,93

A relação linear entre os valores de concentração de resina ( $C_{res}$ ) e das constantes cinéticas de adsorção ( $k_1$ ) é mostrada na Figura 38.

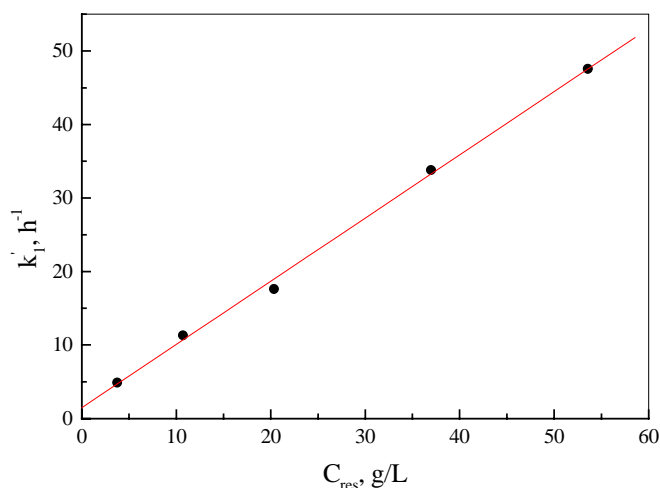


Figura 38. Constante cinética de adsorção do ácido clavulânico em IRA400 ( $k_1$ ) em função da concentração de resina ( $C_0$ ) a 26°C.

A reta ajustada aos dados experimentais é definida pela seguinte equação:

$$k_1 = 0,86 + 1,473.C_{res} \quad (\text{Eq. 15})$$

Assim, pode-se dizer que nas condições geralmente utilizadas pelas indústrias ( $C_0 \cong 1$  g/L), a velocidade de adsorção do ácido clavulânico pela resina IRA400 é aproximadamente 10 vezes maior do que para as soluções diluídas ( $C_0 \cong 70$  mg/L).

### 5.10. Cinética de adsorção em IRA400 em condições próximas às reais

Para a determinação da constante de velocidade de adsorção do ácido clavulânico em IRA400, em condições mais próximas às dos caldos fermentativos obtidos em nossos

laboratórios, empregou-se uma solução 200 mg/L com força iônica igual a 0,09 mol/L. Os dados obtidos experimentalmente (Tabela 42) mostram que a fração máxima adsorvida está em torno de 65%, para uma relação  $C_{res}/C_0$  igual a 1000.

Tabela 42. Valores de concentração de ácido clavulânico livre e fração adsorvida em função do tempo para a adsorção em batelada a 26°C e  $C_0=200\text{mg/L}$ , empregando-se uma relação  $C_{res}/C_0=1000$ .

Tempo, min	Concentração livre, mg/L	Fração adsorvida
0	168,4	0
0,5	109,1	0,352
1	96,7	0,426
2	85,1	0,495
4	75,7	0,550
6	71,0	0,579
10	66,0	0,608
15	61,2	0,636
30	55,8	0,668
45	57,5	0,659

Um modelo exponencial não se ajusta satisfatoriamente aos dados experimentais (Figura 39), uma vez que, a concentração de resina ( $C_{res}=200\text{ g/L}$ ) é muito elevada e, sendo assim, o comportamento é diferente daquele observado para sistemas diluídos.

Finalmente, pode-se concluir que para se obter um rendimento ótimo de adsorção do ácido clavulânico em IRA400 em condições reais deve-se utilizar uma proporção  $C_{res}/C_0$  muito elevada. Então, como era de se esperar esse tipo de recuperação deve ser realizada empregando-se leito fixo que permite a utilização de grandes quantidades de resina.

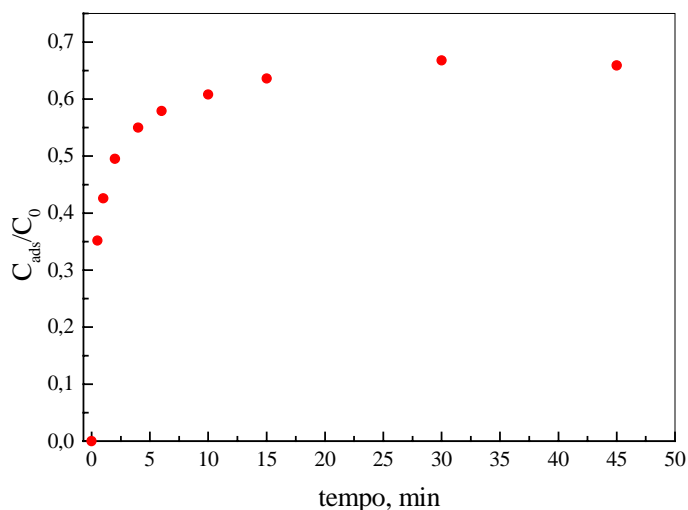


Figura 39. Gráfico da fração de ácido clavulânico adsorvida em função do tempo para a adsorção em batelada a 26°C e  $C_0=200\text{mg/L}$ , empregando-se uma relação  $C_{res}/C_0=1000$ .



### 5.11. Isoterma de adsorção do ácido clavulânico em IRA400

Como as resinas não-iônicas não adsorveram o ácido clavulânico presente em solução, não foi possível obter-se isotermas para esses casos.

Para a resina IRA400 foram feitas várias tentativas até se chegar nas condições adequadas para se obter a isoterma. No primeiro experimento, com 3,75g/L de resina, obteve-se valores de absorvâncias finais muito baixos (Tabela 43), os quais não puderam ser utilizados para o cálculo exato das concentrações de AC no equilíbrio.

Tabela 43. Valores de absorvância a 234 nm das soluções sobrenadantes, após 6 horas, para 3,75g/L de IRA400 a 25°C.

<b>Concentração inicial de AC, mg/L</b>	<b>Absorvância a 234nm após 6 horas</b>
18,08	0,020
27,09	0,024
36,11	0,029
46,78	0,040
55,69	0,056
63,57	0,061

Decidiu-se então diminuir a concentração de resina para 0,02g/L, a fim de que restasse em solução uma quantidade maior de ácido clavulânico não adsorvido. Desta forma, os valores de absorvância do sobrenadante tornaram-se maiores e as concentrações finais foram estimadas com maior precisão (Tabela 44). Neste caso, foi utilizada a curva padrão a 227 nm, uma vez que, nesse comprimento de onda os valores de absorvância, para uma mesma concentração, são maiores do que a 234 nm.

Tabela 44. Valores de absorvância a 227 nm e concentrações finais das soluções sobrenadantes, após 6 horas, para 0,02 g/L de IRA400 a 25°C.

<b>Concentração inicial, mg/L</b>	<b>Absorvância final a 227nm</b>	<b>Concentração final, mg/L</b>
4,8	0,102	3,7
5,7	0,120	4,6
7,3	0,150	6,0
8,3	0,170	6,9
9,8	0,200	8,3

Com os valores de concentração inicial e final, foi possível determinar-se a massa de ácido clavulânico adsorvida por unidade de adsorvente (q) (Tabela 45) e com isso, a isoterma foi ajustada (Figura 40).

Tabela 45. Valores das massas de ácido clavulânico adsorvidas (mg) por unidade (g) de IRA400 a 25°C.

Concentração inicial de AC, mg/L	q, mg <sub>AC</sub> /g <sub>resina</sub>
4,80	53,118
5,73	57,737
7,25	64,665
8,27	69,284
9,75	73,903

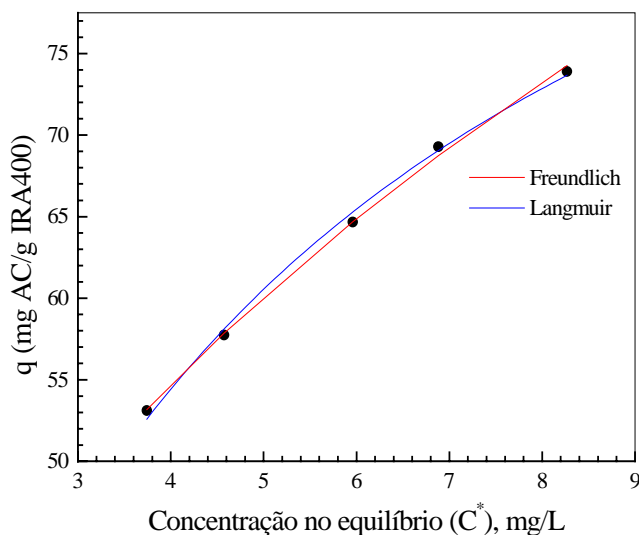


Figura 40. Isotermas de adsorção do ácido clavulânico em IRA400 a 25°C e 200 rpm: (—) modelo de Langmuir e (—) modelo de Freundlich.

Pode-se notar que os modelos de adsorção de Langmuir e Freundlich se ajustaram muito bem aos pontos experimentais. Os valores dos parâmetros  $q_{max}$  e  $k_L$  do modelo de Langmuir e de  $k_F$  e  $n$  do modelo de Freundlich foram estimados e aparecem na Tabela 46.

Tabela 46. Valores dos parâmetros dos modelos de Langmuir e Freundlich, ajustados para a adsorção do ácido clavulânico em IRA400 a 25°C e 200 rpm.

Modelo	Freundlich		Langmuir	
	$k_F$	$n$	$k_L$	$q_{max}$
<b>Valor</b>	30,49191	0,42134	4,10085	110,1999
<b>Erro</b>	0,54624	0,00985	0,24043	2,65549
$\chi^2$	0,14854		0,30245	

A partir dos dados experimentais pode-se estimar a afinidade da resina IRA400 pelo ácido clavulânico. Nota-se pela Figura 38 que em valores de  $C^*$  menores que 7 têm-se uma relação linear entre a concentração livre e a massa de ácido clavulânico adsorvido por

unidade de adsorvente (q). Assim, a partir do valor do coeficiente angular ( $dq/dC^*$ ) e da área superficial da resina (A), pode-se obter a afinidade ( $\alpha$ ):

$$\alpha = \frac{dq}{dC^*} \cdot A \quad (\text{Eq. 16})$$

O valor de  $dq/dC^*$  obtido experimentalmente é igual a  $5,1212 \pm 0,0789$ . Considerando-se  $A=1,1044 \text{ m}^2/\text{g}$ , chega-se a um valor de afinidade da IRA400 pelo ácido clavulânico igual a  $4,637 \text{ L/m}^2$ .

### 5.12. Determinação da entalpia de adsorção do ácido clavulânico em IRA400

Os valores das entalpias de adsorção do ácido clavulânico foram determinados, a partir dos calores liberados pela interação da mistura de clavulanato de potássio e sílica com a resina em solução.

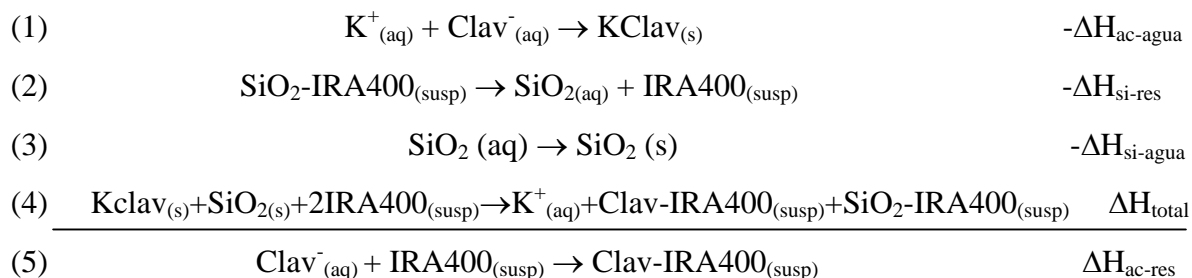
O calor total liberado no momento da quebra da ampola, contendo a mistura de ácido clavulânico e sílica, deve-se aos diferentes fenômenos que ocorrem quando esses dois compostos entram em contato com a água e com a resina em suspensão. Esses fenômenos são: a) dissolução do ácido clavulânico em água; b) interação da sílica com a água; c) interação da sílica com a superfície da resina e d) adsorção do ácido clavulânico.

Os valores experimentais dos calores liberados e das variações de entalpia obtidos experimentalmente são mostrados na Tabela 47.

Tabela 47. Valores dos calores (Q) e das variações de entalpia ( $\Delta H$ ) envolvidos nas interações do ácido clavulânico e da sílica com a água e com diversas resinas.

Experimentos	Q J	$\Delta H$ KJ/mol	Símbolo
Clavulanato de potássio + sílica (0,396 g) em água	-1,1685	-1,5065	$\Delta H_{\text{mis-agua}}$
Clavulanato de potássio + sílica (0,4046 g) em HP20	-1,5535	-1,9613	$\Delta H_{\text{total}}$
Clavulanato de potássio + sílica (0,4337 g) em IRA400/CI	-3,1805	-3,7453	$\Delta H_{\text{total}}$
Clavulanato de potássio+ sílica (0,4086 g) em IRA400/OH	-0,2282	-0,2853	$\Delta H_{\text{total}}$
Clavulanato de potássio + sílica (0,4000 g) em XAD4	-6,8045	-8,6870	$\Delta H_{\text{total}}$
Clavulanato de potássio + sílica (0,4015 g) em XAD7	-6,0500	-7,6945	$\Delta H_{\text{total}}$
Clavulanato de potássio + sílica (0,4009 g) em XAD761	-6,2250	-7,9290	$\Delta H_{\text{total}}$
Sílica (0,0993 g) em água	-1,5960	-0,9659	$\Delta H_{\text{si-agua}}$
Sílica (0,1300 g) em HP20	-2,022	-0,9345	$\Delta H_{\text{si-res/agua}}$
Sílica (0,1352 g) em IRA400	-1,4145	-0,6284	$\Delta H_{\text{si-res/agua}}$
Sílica (0,1216 g) em XAD4	-2,234	-1,1040	$\Delta H_{\text{si-res/agua}}$
Sílica (0,1343 g) em XAD7	-2,8545	-1,277	$\Delta H_{\text{si-res/agua}}$
Sílica (0,1366 g) em XAD761	-2,4725	-1,0875	$\Delta H_{\text{si-res/agua}}$

Assim, para se obter a entalpia de interação (adsorção) do ácido clavulânico nas resinas, deve-se descontar as variações de calor decorrentes dos outros fenômenos:



A variação de entalpia de adsorção do ácido clavulânico ( $\Delta H_{\text{ac-res}}$ ) é dada por:

$$\Delta H_{\text{ac-res}} = \Delta H_{\text{total}} + (-\Delta H_{\text{ac-agua}}) + (-\Delta H_{\text{si-res}}) + (-\Delta H_{\text{si-agua}}) \quad (\text{Eq. 17})$$

O valor da entalpia de dissolução do clavulanato de potássio em água ( $\Delta H_{\text{ac-agua}}$ ) é obtido a partir dos dados das interações da mistura ( $\Delta H_{\text{mis-agua}}$ ) e da sílica ( $\Delta H_{\text{si-agua}}$ ) com a água:

$$(\Delta H_{\text{ac-agua}}) = (\Delta H_{\text{mist-agua}}) + (-\Delta H_{\text{si-agua}}) \quad (\text{Eq. 18})$$

$$(\Delta H_{\text{ac-agua}}) = -1,5065 + (0,9659) = -0,5406 \text{ KJ/mol}$$

De maneira semelhante, as variações de entalpia das interações da sílica com a superfície das resinas podem ser obtidas a partir dos valores experimentais. Assim:

$$(\Delta H_{\text{si-res}}) = (\Delta H_{\text{si-res/agua}}) + (-\Delta H_{\text{si-agua}}) \quad (\text{Eq. 19})$$

Esses valores de  $\Delta H_{\text{si-res}}$  são mostrados na Tabela 48, juntamente com as variações de entalpia de interação do ácido clavulânico à superfície das diversas resinas estudadas (calculadas através da Equação 17).

Pode-se notar que as variações de entalpia envolvidas na interação das resinas XAD4, XAD7 e XAD761 são maiores que para a resina de troca-iônica IRA400, No entanto, como já foi mostrado anteriormente a adsorção do ácido clavulânico nas resinas neutras foi insignificante, o que não favoreceu a continuidade dos estudos com esses adsorventes.

Tabela 48. Valores das variações de entalpia envolvidas na interação da sílica e do ácido clavulânico com a superfície de diversas resinas a 25°C.

<b>Interação</b>	<b><math>\Delta H</math>, KJ/mol</b>
Sílica em HP20	0,0314
Sílica em IRA400	0,3375
Sílica em XAD4	-0,1381
Sílica em XAD7	-0,3111
Sílica em XAD761	-0,1216
Ácido clavulânico em HP20	-0,4863
Ácido clavulânico em IRA400	-2,5764
Ácido clavulânico em XAD4	-7,0425
Ácido clavulânico em XAD7	-5,8770
Ácido clavulânico em XAD761	-6,3010

Para a determinação da entalpia de adsorção ( $\Delta H_{ads}$ ) do ácido clavulânico em IRA400 deve-se levar em conta a concentração adsorvida e o calor de interação (Chaubal et al.,1995). Assim:

$$\Delta H_{ads} = \frac{Q_{ads}}{V.C_{ads}} \quad (\text{Eq. 20})$$

onde V corresponde ao volume de solução na célula calorimétrica (0,07 L) e  $C_{ads}$  corresponde à concentração de ácido clavulânico adsorvida pela resina IRA400.

Levando-se em consideração os calores envolvidos em todos os fenômenos de interação da mistura com a água e a resina e os números de moles de cada componente (Tabela 49), obtém-se o valor de  $Q_{ads}$ .

Tabela 49. Valores dos calores (Q) envolvidos na interação de uma mistura de ácido clavulânico e sílica com a resina IRA400 a 25°C.

<b>Fenômeno</b>	<b>Nº de moles</b>	<b>Q (J)</b>
Dissolução do ácido clavulânico em água	$8,493.10^{-4}$ de KClav	-0,459
Interação da sílica com a resina e com água	$3,86.10^{-3}$ de $SiO_2$	-2,425
Interação da $SiO_2$ e Kclav com a resina	$8,493.10^{-4}$ de Kclav + $3,86.10^{-3}$ de $SiO_2$	-3,181
Adsorção do Kclav em IRA400	$8,493.10^{-4}$ de Kclav	- 0,297

Assim, a variação de entalpia envolvida nesse processo exotérmico de interação é obtida. Como a concentração de clavulanato de potássio adsorvida pela resina é igual a

$4,99 \cdot 10^{-3}$  mol/L, chega-se através da Equação 20 a um valor de variação de entalpia igual a  $-0,849$  kJ/mol.

## 6. CONCLUSÕES

Nos estudos de degradação do ácido clavulânico em solução aquosa constatou-se uma maior estabilidade do composto na faixa de pH de 4,5 a 7,5 e velocidades de hidrólise muito mais elevadas em soluções básicas, relativamente à sua estabilidade em meios ácidos. Ainda, através dos valores das constantes parciais de degradação, pôde-se observar que o ácido clavulânico apresenta velocidades de hidrólise bem maiores que as obtidas na literatura em estudo semelhante com a cefalosporina C, a 25°C.

A determinação da faixa de pH de maior estabilidade do ácido clavulânico permitiu estabelecer valores adequados para investigação da adsorção deste composto  $\beta$ -lactâmico nas resinas XAD4, XAD761 e IRA400. A taxa de recuperação foi muito elevada com a resina de troca-iônica IRA400, em torno de 95%. Não foram constatadas retenções significativas nos demais adsorventes utilizados.

A recuperação do ácido clavulânico a partir de soluções aquosas empregando-se XAD4 e aminoácidos como contra-íons não se mostrou eficaz. A fenilalanina interagiu com a resina mas não com o inibidor, enquanto que lisina e arginina nem foram adsorvidas. Desta forma, os estudos de adsorção subsequentes foram realizados somente com a resina IRA400.

O rendimento de dessorção dos íons clavulanato com soluções de cloreto de sódio (5% e 10%) mostrou-se satisfatório, situando-se em torno de 70-75% com relação à quantidade inicialmente adsorvida.

Também foi investigada a influência de parâmetros como temperatura, concentração de resina, pH e força iônica ( $\mu$ ) no fenômeno de troca-iônica. Excetuando-se a temperatura, que não acarretou variações na velocidade de adsorção devido à estreita faixa de valores estudados (22-30°C), os demais fatores afetaram significativamente o processo.

Verificou-se que valores mais altos de pH promoveram um aumento no rendimento de adsorção. Estes resultados indicaram uma faixa de trabalho adequada de pH entre 7,5 e 8,0, região na qual a degradação do ácido clavulânico por hidrólise ainda é mínima, considerando-se o tempo de processo, em torno de 30 min para uma concentração inicial de 70 mg/L do composto. Para uma concentração inicial de 1 g/L de ácido clavulânico, o tempo de adsorção reduziu-se para cerca de 5 minutos.

Experimentos variando-se a força iônica mostraram que este fator exerce uma influência bastante pronunciada no rendimento de adsorção em IRA400. Observou-se que, para soluções aquosas com  $\mu = 0,09$  mol ions/L foi necessária uma concentração de resina cerca de 8 vezes maior do que aquela utilizada na recuperação da mesma quantidade de ácido clavulânico em condições de  $\mu \leq 0,01$ .

Através do valor da afinidade do composto pela resina IRA400 ( $\alpha=4,64$  L/m<sup>2</sup>), pode-se concluir que este adsorvente é, do ponto de vista termodinâmico, apropriado para a recuperação do ácido clavulânico a partir de meios aquosos. Comparativamente à retenção de outros compostos terapêuticos (penicilina V, tetraciclina e cefalosporina C) em adsorventes neutros (XAD16 e XAD7), a energia de interação do ácido clavulânico em IRA400 mostrou-se  $10^2$ - $10^3$  vezes maior.

Os trabalhos disponíveis na literatura referentes à adsorção do ácido clavulânico são escassos, limitando-se a duas referências (Mayer et. al, 1996 e 1997). Assim, os estudos realizados no presente trabalho visam contribuir para futuras investigações de processos de purificação deste composto, a partir de caldos fermentativos.



## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDEL-MOETY, E.M.; ABOUNASSIF, M.A.; MOHAMED, M.E.; KHATTAB, N.A. Spectrophotometric determination of amoxicillin and clavulanic acid in pharmaceutical preparations. *Talanta*, v. 36, n. 6, p. 683-685, 1989.
- ANDERSSON, B.; ANDERSSON, K. Use of Amberlite XAD-7 as a concentrator column in the analysis of endogenous plant growth hormones. *Journal of Chromatography*, v. 242, p. 353-358, 1982.
- BAGGALEY, K.H., BROWN, A.G., SCHOFIELD, C.J. Chemistry and biosynthesis of clavulanic acid and others clavams. *Natural Product Reports*, v. 14, n. 4, p. 309-333, 1997.
- BAUTISTA, L.F.; MARTÍNEZ, M.; ARACIL, J. Adsorption equilibrium of  $\alpha$ -amylase in aqueous solutions. *AIChE Journal*, v. 45, n. 4, p. 761-768, 1999.
- BERSANETTI, P.A., BARBOZA, M., HOKKA, C.O., ARAUJO, M.L.G.C. Estudos cinéticos de hidrólise do ácido clavulânico. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE FERMENTAÇÕES, 13., 2000, Teresópolis. *Anais...* Rio de Janeiro: UFRJ, COPPE, 2000. 1 CD.
- BIRD, A.E.; BELLIS, J.M.; GASSON, B.C. Spectrophotometric assay of clavulanic acid by reaction with imidazole. *Analyst*, v. 107, p. 1241-1245, 1982.
- BUCKTON, G.; BEEZER, A.E. The applications of microcalorimetry in the field of physical pharmacy. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 72, p. 181-191, 1991.
- BUCKTON, G. Applications of isothermal microcalorimetry in the pharmaceutical sciences. *Thermochimica Acta*, v. 248, p. 117-129, 1995.
- BUTTERWORTH, D. Clavulanic acid: properties, biosynthesis and fermentation. In: VANDAMME, E.J. *Biotechnology of industrial antibiotics*. New York: Marcel Dekker, 1984. p.3-31.

CARTWRIGHT, S.J.; COULSON, A.F.W. A semi-synthetic penicillinase inactivator. *Nature*, v. 278, n. 22, p. 360-361, 1979.

CASILLAS, J.L.; ADDO-YOBO, F.; KENNEY, C.N.; ARACIL, J.; MARTÍNEZ, M. The use of modified divinylbenzene-polystyrene resins in the separation of fermentation products. A case study utilizing amino acids and dipeptide. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, v. 55, p. 163-169, 1992.

CASSIDY, H.G. *Adsorption and chromatography: technique of organic chemistry*. New York: Interscience, 1951. v. 5, p. 267-268.

CHARNAS, R.L.; FISHER, J.; KNOWLES, J.R. Chemical studies on the inactivation of *Escherichia coli* RTEM  $\beta$ -lactamase by clavulanic acid. *Biochemistry*, v. 17, n. 11, p. 2185-2188, 1978.

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

CHAUBAL, M.V., PAYNE, G.F.; REYNOLDS, C.H.; ALBRIGHT, R.L. Equilibria for the adsorption of antibiotics onto neutral polymeric sorbents: experimental and modeling studies. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 47, n. 2, p. 215-226, 1995.

COLE, M.; HOWARTH, T.T.; READING, C. Antibiotic from *Streptomyces clavuligerus*. Beecham Group (GB2). US n. 4529720, 24 setembro 1981, 16 julho 1985.

DORRESTEIJN, R.C.; BERWALD, L.G.; ZOMER, G.; GOOIJER, C.D.; WIETEN, G.; BEUVERY, E.C. Determination of amino acids using o-phthalaldehyde-2-mercaptoethanol derivatization: effect of reaction conditions. *Journal of Chromatography A*, v. 724, p. 159-167, 1996.

ECKERS, C.; CHALKLEY, R.; HASKINS, N.; EDWARDS, J.; GRIFFIN, J.; ELSON, S. Investigation into the use of derivatization with imidazole for the detection of clavam

compounds by liquid chromatography- mass spectrometry. *Analytical Communications*, v. 33, p. 215-218, 1996.

EKSBORG, S.; LAGERSTRÖM, P.O.; MODIN, R.; SCHILL, G. Ion-pair chromatography of organic compounds. *Journal of Chromatography*, v. 83, p. 99-110, 1973.

FISHER, J.; CHARNAS, R.L.; KNOWLES, J.R. Kinetic studies on the inactivation of *Escherichia coli* RTEM  $\beta$ -lactamase by clavulanic acid. *Biochemistry*, v. 17, n. 11, p. 2180-2184, 1978.

FOULSTONE, M.; READING, C. Assay of amoxicillin and clavulanic acid, the components of Augmentin, in biological fluids with high-performance liquid chromatography. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 22, n. 5, p. 753-762, 1982.

FRAU, J.; DONOSO, J.; MUÑOZ, F.; GARCIA-BLANCO, F. Theoretical calculations of  $\beta$ -lactam antibiotics: AM1 calculations of alkaline hydrolysis of clavulanic acid. *Helvetica Chimica Acta*, v. 77, p. 1557-1569, 1994.

GOMORI, G. Preparation of buffers for use in enzyme studies. In: COLOWICK, S.; KAPLAN, N.O. *Methods in enzymology*. New York: Academic Press, 1955. v. 1, p. 138-146.

HAGINAKA, J.; YASUDA, H.; UNO, T.; NAKAGAWA, T. Degradation of clavulanic acid in aqueous alkaline solution: isolation and structural investigation of degradation products. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, v. 33, n. 1, p. 218-224, 1985.

HAGINAKA, J.; YASUDA, H.; UNO, T.; NAKAGAWA, T. High-performance liquid chromatography assay of clavulanate in human plasma and urine by fluorimetric detection. *Journal of Chromatography*, v. 377, p. 269-277, 1986.

HARLAND, C.E. *Ion exchange: theory and practice*. 2.ed. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 1994. p. 1-2, 252-253.

- ISHIDA, Y.; FUJITA, T.; ASAI, K. New detection and separation method for amino acids by high-performance liquid chromatography. *Journal Chromatography*, v. 204, p. 143-148, 1981.
- IVES, P.R.; BUSHELL, M.E. Manipulation of the physiology of clavulanic acid production in *Streptomyces clavuligerus*. *Microbiology*, v. 143, p. 3573-3579, 1997.
- JACOBSON, J.; FRENZ J.; HORVÁTH, C. Measurement of adsorption isotherms by liquid chromatography. *Journal of Chromatography*, v. 316, p. 53-68, 1984.
- KAMIMURA, E.S. *Modelagem e simulação de coluna cromatográfica por afinidade para purificação de proteína*. 1995. 76 f. Tese de Mestrado - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
- KONECNY, J.; FELBER, E.; GRUNER, J. Kinetics of hidrolisis of cephalosporin C. *The Journal of Antibiotics*, v. xxvi, n. 3, p. 135-141, 1975.
- LACAZ, C.S. *Antibióticos*. 3.ed. São Paulo: Universidade de São Paulo, 1975. p.1-4.
- LAILER, K.J. *Chemical kinetics*. New York: Mc Graw Hill, 1950. p. 282-294.
- LATHAM, J.L. *Cinética elementar de reação*. Trad. M. T. Cataldi. São Paulo: Universidade de São Paulo, 1974. p. 8-9, 43-44.
- LEVENSPIEL, O. *Engenharia das reações químicas: cinética química aplicada*. Trad. S.F.Calil; P.M. Buchler. São Paulo: Universidade de São Paulo, 1974. v. 1, p. 6-11.
- LIMA, U.A. Separação dos produtos de fermentação. In: Borzani, W.; Lima, U.A.; Aquarone, E. *Biotecnologia: engenharia bioquímica*. São Paulo: Edgard Blücher, 1975. v.3, pg. 276-277.
- LLINÁS, A.; VILANOVA, B.; FRAU, J.; MUÑOZ, F.; DONOSO, J.; PAGE, M.I. Chemical reactivity of penicillins and cephalosporins: intramolecular involvement of the acyl-amido side chain. *Journal Organic Chemistry*, v. 63, n. 24, p. 9052-9060, 1998.

LOW, A.S.; TAYLOR, R.B.; GOULD, I.M. Determination of clavulanic acid by a sensitive HPLC method. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 24, supl. B, p. 83-86, 1989.

MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; PARKER, J. *Brock Biology of Microorganisms*. 8th.ed. New Jersey: Prentice Hall, 1997. p. 435, 442-445.

MARTÍN, J.; MÉNDEZ, R. High-performance liquid chromatographic determination of clavulanic acid in human serum and urine using a pre-column reaction with 1,2,4-triazole. *Journal of Liquid Chromatography*, v. 11, n. 8, p. 1697-1705, 1988.

MAYER, A.F.; ANSPACH, F.B.; DECKWER, W.D. Purification of clavulanic acid by ion-pairing systems. *Bioseparations*, v. 6, p. 25-39, 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.; ALEMANY, T.; MARTÍN-VILLACORTA, J. Stability in aqueous solution of two monocyclic  $\beta$ -lactam antibiotics: aztreonam and nocardicin A. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, v. 40, n. 12, p. 3222-3227, 1992.

MOORE, W.J. *Físico química*. Trad. T. Rabockai, I. Jordan, M. C. Ferreroni. 4.ed. São Paulo: Universidade de São Paulo, 1976. v. 1, p. 304-305.

MORRISON, R.; BOYD, R. *Química Orgânica*. 11 ed. Trad. Silva M.A. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1994. p.993-994.

OKAMOTO, Y.; KIRIYAMA, K.; NAMIKI, Y.; MATSUSHITA, J.; FUJIOKA, M.; YASUDA, T. Degradation kinetics and isomerization of cefdinir: a new oral cephalosporin in aqueous solution. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 85, n. 9, p. 976-983, 1996.

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

PITARCH, J.; RUIZ-LÓPEZ, M.F.; SILLA, E.; PASCUAL-AHUIR, J-L; TUNÓN, I. Neutral and alkaline hydrolysis of model  $\beta$ -lactam antibiotics: an initio study of water catalysis. *Journal of American Chemical Society*, v. 120, n. 9, p. 2146-2155, 1998.

PRASAD, R.; GUPTA, A.K.; BAJPAI, R.K. Adsorption of streptomycin on ion exchange resins: equilibrium and kinetic studies. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, v. 30, p. 324-331, 1980.

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

READING, C.; FARMER, T. The inhibition of  $\beta$ -lactamases from gram-negative bacteria by clavulanic acid. *The Biochemical Journal*, v. 199, p. 779-787, 1981.

REGIS TECHNOLOGIES INC. *Chromatography catalog*. Morton Grove: United States, 1998, p. 66-67.

RILEY, C.M. Modes of chromatography. In: LOUGH, W.J.; WAINER, I.W. *High performance liquid chromatography: fundamental principles and practice*. London: Blackie Academic and Professional, 1997. cap. 3, p. 61-74.

ROHM AND HASS COMPANY. *Amberlite XAD polymeric adsorbents: ion exchange resins*, 1995.

ROSS, G. W.; O'CALLAGHAN, C. H.  $\beta$ -Lactamases assays. In: COLOWICK, S.; KAPLAN, N.O. *Methods in enzymology*. New York: Academic Press, 1975. v. 43, p. 69-73.

STANBURY, P.F.; WHITAKER, A. *Principles of fermentation technology*, New York: Pergamon Press, 1984. p. 1-10.

SCHMIDT-KASTNER, G.; GÖLKER, C. Product recovery in biotechnology. In: Präve, P. et al. *Fundamentals of biotechnology*. Trad. B.J. Hazzard. Weinheim: VCH, 1987. p. 304-306, 311.

SEWELL, P.A.; CLARKE, B. *Chromatographic separations*. London: John Wiley & Sons, 1997. p. 22-36.

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

VILANOVA, B.; MUNÓZ, F.; DONOSO, J.; GARCIA-BLANCO, F. HPLC and H-NMR studies of alkaline hydrolysis of some 7-(oxyiminoacyl)cephalosporins. *Helvetica Chimica Acta*, v. 76, p. 2789-2801, 1993.

VILANOVA, B.; MUNÓZ, F.; DONOSO, J.; GARCIA-BLANCO, F. Degradation of cephaloridine on alkaline hydrolysis. *Helvetica Chimica Acta*, v. 76, p. 1619-1625, 1993.

VILANOVA, B.; DONOSO, J.; MUNÓZ, F.; GARCIA-BLANCO, F. Alkaline hydrolysis of cephaloridine: an H-NMR study. Temperature dependence of the rate constants. *International Journal of Chemical Kinetics*, v. 25, p. 865-874, 1993.

VILANOVA, B.; MUNÓZ, F.; DONOSO, J.; FRAU, J.; GARCIA-BLANCO, F. Alkaline hydrolysis of cefotaxime: a HPLC and H-NMR study. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 83, n.3, p. 322-327, 1994.

VILANOVA, B.; DONOSO, J.; MUNÓZ, F.; GARCIA-BLANCO, F. The degradation mechanism of an oral cephalosporin: cefaclor. *Helvetica Chimica Acta*, v. 79, p. 1793-1802, 1996.