

ESTABILIDADE DO ÁCIDO CLAVULÂNICO: INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA, pH, FORÇA IÔNICA E PRESSÃO

Milena Q.G.C de Campos*, Priscila H. Carvalho, Marcus B.S. Forte

Resumo

O presente trabalho apresenta um estudo da estabilidade do Ácido Clavulânico (CA), através da constante de hidrólise, em diferentes condições de temperatura (T de 15 a 35 °C), pH (de 4,0 a 8,0), concentração de tampão (CT de 20 a 100 mM) e pressão (P de 1 a 30 bar) simultaneamente através de delineamento fatorial fracionado (DFF). Os efeitos das variáveis foram analisados pelo diagrama de pareto, através do qual foi observado a influência positiva na hidrólise de CA dos fatores T e CT. Os fatores pH e P não mostraram efeitos significativos nos níveis estudados.

Palavras-chave:

Ácido Clavulânico, estabilidade, planejamento experimental.

Introdução

O ácido clavulânico (CA) é um composto β -lactâmico produzido por *Streptomyces clavuligerus*, potente inibidor de β -lactamases, enzimas que reduzem a atividade de antibióticos como penicilina e cefalosporina. Esse bioproduto é altamente instável, afetando os rendimentos das etapas de purificação. Assim, o objetivo do presente trabalho é avaliar a estabilidade do CA em função da temperatura, concentração de tampão, pH e pressão, através de um delineamento fatorial fracionado (DFF), uma metodologia estatística de análise de efeitos simultânea e multivariada.

Resultados e Discussão

Realizou-se um DFF 2^{4-1} com adição de 3 pontos centrais, totalizando 11 experimentos, como pode ser visto na Tabela 1.

Tabela 1. Planejamento DFF para hidrólise de CA.

Ensaio	T (°C)	pH	CT (mM)	P (bar)	$k \cdot 10^3$ (h ⁻¹)
1	15 (-1)	4 (-1)	20 (-1)	1 (-1)	12,9
2	35 (+1)	4 (-1)	20 (-1)	30 (+1)	61,0
3	15 (-1)	8 (+1)	20 (-1)	30 (+1)	9,8
4	35 (+1)	8 (+1)	20 (-1)	1 (-1)	44,2
5	15 (-1)	4 (-1)	100 (+1)	30 (+1)	26,1
6	35 (+1)	4 (-1)	100 (+1)	1 (-1)	81,0
7	15 (-1)	8 (+1)	100 (+1)	1 (-1)	33,7
8	35 (+1)	8 (+1)	100 (+1)	30 (+1)	80,3
9	25 (0)	6 (0)	60 (0)	15,5 (0)	5,5
10	25 (0)	6 (0)	60 (0)	15,5 (0)	3,1
11	25 (0)	6 (0)	60 (0)	15,5 (0)	10,7

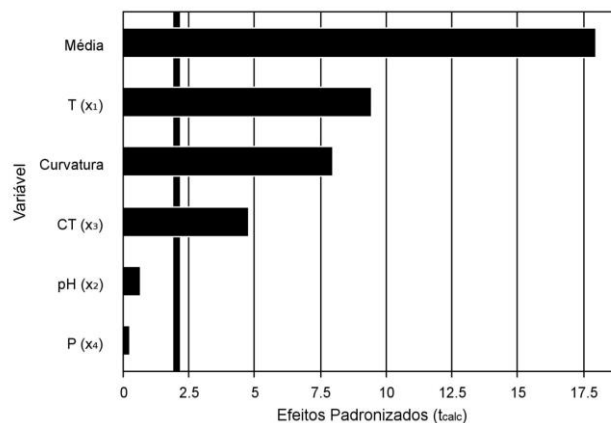
A resposta k (constante de hidrólise) corresponde à inclinação da reta $-\ln(C/C_0)$ em função do tempo, sendo C_0 e C as concentrações de CA inicial e final (5 h), determinadas por método espectrofotométrico^[1]. Os resultados foram analisados pelo software online Protimiza Experimental Design (<http://experimental-design.protimiza.com.br/>) que forneceu o efeito de cada parâmetro (Tabela 2), cuja significância pode ser vista no diagrama de Pareto ao nível de confiança de 90 % (Figura 1). Observa-se efeito significativo da curvatura, ou seja, entre os níveis (-1) e superior (+1), existe um

ponto de máximo ou de mínimo. Tanto T quanto CT têm efeito significativo positivo, logo, há aumento de k com o incremento de ambos T e CT. O pH não teve efeito significativo na degradação de CA nos níveis estudados, concordando com resultados da literatura para os níveis estudados^[2]. Já a variável P não apresentou efeito significativo.

Tabela 2. Resposta Software Optimiza: efeitos

Nome	Média	Curv.	T	pH	CT	P
Efeito	43,63	-74,38	46,00	-3,25	23,30	1,35

Figura 1. Diagrama de Pareto: efeitos padronizados.



Conclusões

Conclui-se que temperatura e concentração de tampão são determinantes na degradação de ácido clavulânico, tendo efeito positivo, ao passo que pH (na faixa de 4,0 a 8,0) e pressão (na faixa de 1 a 30 bar) têm efeito não-significativo, nas faixas estudadas. Vale ressaltar que é a primeira vez que a influência da pressão na degradação de ácido clavulânico. Essa é uma informação importante já que altas pressões podem ser usadas em etapas futuras de purificação dessa biomolécula.

Agradecimentos

Agradeço à Unicamp pela oportunidade e incentivo à realização desta pesquisa. Agradeço ao Prof Dr Marcus Forte por toda a orientação e atenção e a todo o time LEMeB.

¹ Bird, A.E.; Bellis, J.M.; Gasson, B.C. Spectrophotometric assay of clavulanic acid by reaction with imidazole. *Analyst*, **1982**, *107*, 1241.

² Forte, M.B.S.; Elias, E.C.L.; Pastore, H.O.; Mauger Filho, F.; Rodrigues, M.I. *Ads. Sci. Technol.* **2012**, *30*, 65.